

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte. Der erste umfasst Ergebnisse zum Aufbau von Genbanken, ausgehend von isolierter DNA und RNA von *Geosiphon pyriformis*. Die nächsten beiden Abschnitte behandeln Ergebnisse zur molekularbiologischen Charakterisierung von Gensequenzen des Pilz-Partners von *Geosiphon pyriformis*, sowie solche, die den „bacteria-like organisms“ (BLOs) in Sporen und Hyphen von *Geosiphon pyriformis* zugerechnet werden. Der vierte Abschnitt beschäftigt sich mit den physiologischen Experimenten zur Phosphataufnahme und -metabolisierung durch Blasen von *Geosiphon pyriformis* und freilebendem *Nostoc punctiforme*. Außerdem wird in diesem Abschnitt eine Methode zur computergestützten Auswertung von Autoradiogrammen nach 2D-dünnschichtchromatographischer Trennung extrahierter Verbindungen vorgestellt.

4.1 Aufbau und Screening von Genom- und cDNA-Genbanken

Um bei der Charakterisierung von Genen aus *Geosiphon pyriformis* nicht ausschließlich auf das begrenzte Sporen- und sehr knappe Blasenmaterial des Pilz-Partners bzw. der Symbiose angewiesen zu sein, sollten eine genomische und eine cDNA-Genbank aufgebaut werden. Auf diese Art in einen Fremdorganismus kloniertes Genmaterial kann unbegrenzt vermehrt und verwendet werden (KNIPPERS, 1995).

4.1.1 Aufbau einer Genombank mit dem Lambda ZAP II Predigested EcoR I/CIAP-Treated Vector Kit

Der Vektor aus dem Lambda ZAP II Vektor Kit (Stratagene, Heidelberg) kann Fragmente von bis zu 10 kb Länge aufnehmen. Dies hat gegenüber anderen Genbanken, die auf Vektoren größerer Aufnahmekapazität basieren, Vor- und Nachteile. Der wichtigste Nachteil des geringen Fassungsvermögens des Lambda-Vektors besteht darin, dass die Wahrscheinlichkeit, beim Screening einen Vollängenklon eines gesuchten Genabschnitts isolieren zu können, geringer ist, da die einklonierte Fremd-DNA häufiger hydrolytisch gespalten werden muss als bei Vektoren mit größerer Kapazität. Dies kann aber teilweise durch Überlappung verschiedener isolierter Gensequenzen ausgeglichen werden, was aber einen erheblichen Mehraufwand bei Screenings, Umklonieren und Sequenzieren mit sich bringt. Außerdem besteht beim Aufbau jeder Genbank die Gefahr, dass zu kleine Fragmente verloren gehen können. Dem gegenüber steht aber der Vorteil der unproblematischen hydrolytischen Spaltung durch Vollverdau mit EcoR I, während die meisten anderen Vektoren eine partielle Restriktion voraussetzen. Dabei muß durch zeitliche Begrenzung der Restriktions-Reaktion dafür gesorgt werden, dass die meisten Restriktionsfragmente innerhalb der Aufnahmekapazität des Vektors liegen. Für diese Optimierung des Verdaus werden deshalb größere Mengen isolierter DNA benötigt, die nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen.

Die DNA von *G. pyriformis* wurde nach der Methode von Zézé et al. (vgl. 3.2.3.1) aus 1.900 vorher vereinzelter, gereinigter und oberflächensterilisierten Sporen isoliert. Die DNA wurde anschließend einem Vollverdau mit EcoR I unterzogen und 0,3-0,4 µg der

restringierten DNA in den Lambda ZAP II-Vektor ligiert. Mit dem im Gesamtkitsystem enthaltenen Gigapack III Kit wurden die rekombinanten Vektoren in vorgefertigte Phagenhüllproteine verpackt und der Titer dieser primären Bank wurde mit 420.000 pfu/ml bestimmt. Da die Primärbank nur maximal einen Monat stabil ist, wurde eine sekundäre Genbank mit einem Titer von $6,9 \times 10^9$ pfu/ml angezogen. Die erfolgreiche Einklonierung wurde durch eine Kontroll-PCR aus der Phagensuspension (vgl. 3.2.13.3.4) mit den aus dem SSU-rRNA-Gen abgeleiteten Primern NS1 und NS2 nachgewiesen, bei der ein Fragment entsprechender Größe amplifiziert werden konnte. Ein Bild der Gelelektrophorese dieser PCR, bei der 5 µl des PCR-Ansatzes aufgetragen wurden, ist in Abbildung 12 dargestellt.

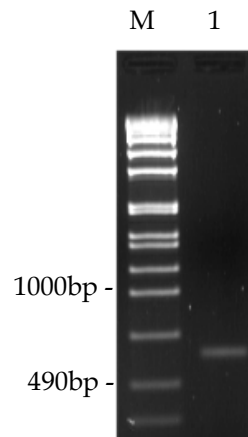


Abb. 12: Direkte PCR aus der genomischen DNA-Genbank mit den Primern NS1 und NS2 zur Kontrolle des erfolgreichen Einbaus von DNA von *Geosiphon pyriformis*
Spurbelegung: M = SPP1/*Eco*RI-Längenstandard, 1 = 5 µl PCR-Ansatz

Damit stand ein System zur Verfügung, das DNA für weitere Experimente, wie z. B. Anreicherung und Vereinzelung von Phagenklonen durch Screening oder Amplifikation von Fragmenten durch direkte PCR zur Verfügung stellte.

4.1.2 Aufbau einer cDNA-Genbank mit dem ZAP-cDNA Synthesis Kit

Mit Hilfe einer cDNA-Genbank sollte versucht werden, Vollängenklone exprimierter Gene der Symbiose *G. pyriformis* zu isolieren. Dabei sind insbesondere der Ausschluss von Intron-Sequenzen und damit die Möglichkeit, die Genprodukte isolierter Gene im heterologen System zu exprimieren und ihre physiologischen Eigenschaften zu charakterisieren, von Vorteil.

Für die cDNA-Genbank aus *G. pyriformis* wurde die Gesamt-RNA aus dem gesamten frischen Blasenmaterial von drei sehr gut gewachsenen Kulturen der Symbiose (ca. 2.500 Blasen, Frischgewicht ca. 0,1 g) mit Hilfe des Qiagen RNeasy Plant Mini Kit unter Verwendung des Lysepuffers RLT in zwei Isolationsansätzen isoliert. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde wegen des hohen Wasseranteils des *Geosiphon*-Blasenmaterials die Ethanolzugabe nach der QIAshredder-Säule auf 300 µl pro Isolationsansatz erhöht. Der Erfolg der RNA-Isolation wurde anschließend in einer denaturierenden RNA-Gelanalyse überprüft. Das Bild des Ethidiumbromid-gefärbten Gels ist in Abbildung 13 dargestellt, die sichtbaren Banden entsprechen dabei der ribosomalen RNA. Auf das Gel wurden 5 µl des RNA-Isolationsansatzes aufgetragen.

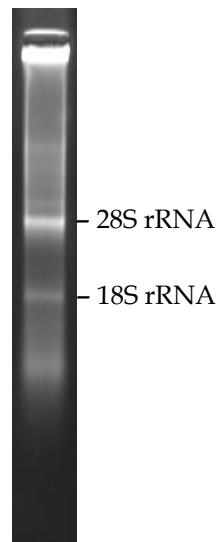


Abb. 13: Gesamt-RNA von *G. pyriformis*,
isoliert mit dem Qiagen RNeasy Plant Mini Kit
aufgetragen: 5 µl RNA-Isolationsansatz

Der Gehalt an Gesamt-RNA wurde, wie bei HEUTE (1999) beschrieben, auf ca. 25 µg abgeschätzt. Die ganze Lösung isolierter Gesamt-RNA (insgesamt 50 µl) wurde zur Isolierung der enthaltenen mRNA mit dem Poly(A) Quik mRNA Isolation Kit der Fa. Stratagene (Heidelberg) eingesetzt, die isolierte mRNA wurde einer Ethanolfällung unterzogen und in 37,5 µl DEPC-behandeltem H₂O_{bidest} wieder aufgelöst. Da nur RNA-Material für diesen einen Versuch zur Verfügung stand, wurde die so hergestellte Lösung ohne weitere Analysen komplett in die Erst- und Zweitstrangsynthese des ZAP-cDNA Synthesis Kits (Stratagene, Heidelberg) nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Erst- und Zweitstrang wurden während der Synthese mit ³²P-dCTP radioaktiv markiert, um die gebildeten cDNA-Stränge nach Herstellerprotokoll durch eine alkalische Gelelektrophorese mit anschließendem Autoradiogramm überprüfen zu können. Während die parallel ausgeführten Testsynthesen mit der dem Kitsystem beiliegenden DNA-Probe der Erwartung entsprechende Ergebnisse zeigte, konnten keine gebildeten Erst- und Zweitstränge aus der eingesetzten mRNA aus Blasen von *Geosiphon pyriformis* nachgewiesen werden. Die einzige sichtbare Markierung lag zwischen zwei Gelspuren und war ein Artefakt durch verschleppte Radioaktivität.

Eine weitere mRNA-Isolierung in größerem Maßstab und damit ein Versuch des Aufbaus einer cDNA-Genbank konnte aufgrund mangelnden Blasenmaterials bislang nicht wiederholt werden.

4.1.3 Screening der genomischen DNA-Genbank

Zum Screening der genomischen DNA-Genbank wurde zunächst eine heterologe Sonde (pKEpho) verwendet. Diese stellt ein ca. 600 bp großes Teilfragment eines cDNA-Klones des *high-affinity*-Phosphattransporters aus *Glomus versiforme* dar und wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. M. J. Harrison von der Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA, für das Genbankscreening zur Verfügung gestellt.

Zum Screening (vgl. 3.2.13.3.3) wurden $1,5 \times 10^5$ Phagen auf vier quadratischen Platten mit NZY-Tetracylin-Agar ausplattiert und von jeder Platte zwei Nylonmembranen (Stratagene Duralon-UV[®]) abgezogen. Die Nylonmembranen wurden, wie oben beschrieben, behandelt und eine Hybridisierungsreaktion mit Formamid und gescherter, denaturierter Heringssperma-DNA zur Vermeidung unspezifischer Bindungen durchgeführt. Erste, orientierende Screenings sowie parallel durchgeführte Screenings an anderen Genbanken (HEUTE, 1999) hatten gezeigt, dass bei Verzicht auf Formamid in der Hybridisierungslösung (d.h. dann: 6x SSC-Puffer, 5x Denhardt's Reagenz, 0,5% SDS) die Zahl der unspezifischen („scheinpositiven“) Bindungen erheblich zunahm. Die Hybridisierungszeit betrug i. d. R. 60 Stunden, gewaschen wurde in mehreren Stufen, bis zu einer hochstringenten Waschlösung aus 0,2x SSC-Puffer mit 0,5 % SDS, 30 min bei einer Waschtemperatur von 60°C.

Durch Screenings mit der genannten heterologen Sonde, sowie Fragmenten unterschiedlicher Länge, die durch PCR mit der genomischen DNA-Bank als Template amplifiziert und als Phosphattransportergenfragmente charakterisiert wurden, konnten mehrere Phagenklone spezifisch angereichert werden. Sequenzierung und BLAST-Suche in den Online-Datenbanken zeigten jedoch keine Übereinstimmung mit bekannten Genfragmenten. Beispielhaft wird in Abbildung 14 die Größenbestimmung der *Geosiphon*-DNA in vereinzelt und angereicherten Phagenklonen durch PCR mit den Standard-Sequenzierprimern T3 und T7 dargestellt.

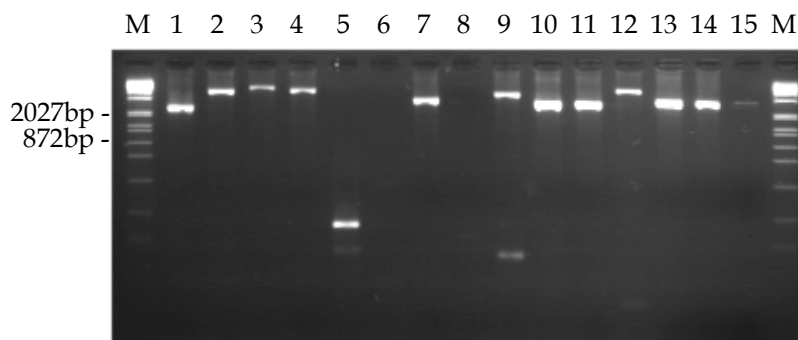


Abb. 14: Größenvergleich der Fremd-DNA in angereicherten Phagenklonen durch direkte PCR aus der genomischen DNA-Genbank mit den Standard-Sequenzierprimern T3 und T7

Spurbelegung: M = Längenstandard Lambda/HindIII und Φ X174/HaeIII, 1 bis 15 = PCR mit T3/T7 aus Phagen-Einzelklon 1eV bis 1eX und 1gI bis 1gX, je 5 μ l

Die genomische DNA-Bank steht jedoch in Zukunft für Screenings mit anderen Genfragmenten als Sonde zur Verfügung.

4.1.4 PCR aus der Phagensuspension der genomischen DNA-Genbank

Mit der PCR aus der Phagensuspension der genomischen DNA-Genbank wurden prinzipiell alle Zwischenschritte beim Screening der Genbank kontrolliert. Durch diese direkte PCR mit den Primern P18 und P19 (vgl. Abbildung 15) und ggf. darauf folgender Sequenzierung des amplifizierten 100 bp-Fragments konnte sichergestellt werden, dass eine Anreicherung positiver Phagenklone durch das Screening stattfand. Bei isolierten, in der PCR mit den Primern P18 und P19 positiven Einzelklonen wurde außerdem, wie oben angesprochen, ein

Größenvergleich der im Phagenvektor insertierten *Geosiphon*-DNA über direkte PCR mit Standard-Sequenzierprimern durchgeführt.

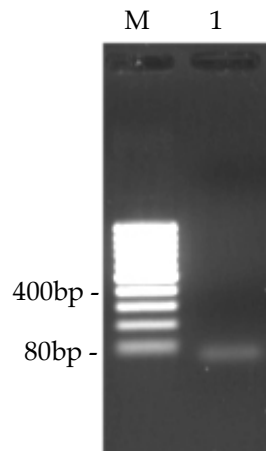


Abb. 15: Direkte PCR aus der genomischen DNA-Genbank mit Primern P18 und P19 zur Insertkontrolle

Spurbelegung: M = Längenstandard 100 bp-Leiter, 1 = 5 µl PCR-Ansatz P18/P19

4.2 Molekularbiologische Charakterisierung pilzlicher Gene

4.2.1 *high-affinity*-Phosphat-Transportergen

Durch PCR mit der Phagensuspension der genomischen DNA-Bank als Template für die Amplifikation (vergl. 4.1.4) und mit für das *high-affinity* Phosphattransportergen spezifischen Primern wurden Fragmente dieses Gens amplifiziert. Dabei wurden bis zu 25 µl (entspricht $1,7 \times 10^8$ pfu) Phagensuspension eingesetzt. Die in den Phagenpartikeln verpackte DNA wurde durch Aufkochen in einem Premix aus sterilem H_2O_{bidest} und PCR-Puffer freigesetzt und anschließend die übrigen Komponenten für die PCR-Reaktion zupipettiert. Prinzipiell wurde bei allen Primerkombinationen eine zweite, verschachtelte (nested-) PCR durchgeführt, um mit erhöhter Spezifität ggf. nur schwach amplifizierte Fragmente weiter zu vervielfältigen. Auf diese Weise wurde mit den Primerkombinationen P2 / P9 in der ersten und P2 / P12 in der nested-PCR ein 340 bp langes Fragment pFV 14.1 amplifiziert und kloniert. Das Gelbild der Agarosegelanalyse nach der ersten und der verschachtelten PCR ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Sequenzierung und BLAST-Suche in den Online-Datenbanken zeigten die in Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse. Aufgrund der hohen Übereinstimmung bzw. Ähnlichkeit der in Aminosäuren übersetzten Gensequenz mit bekannten pilzlichen Phosphattransportergenen konnte der amplifizierte Sequenzabschnitt als Fragment eines solchen charakterisiert werden.

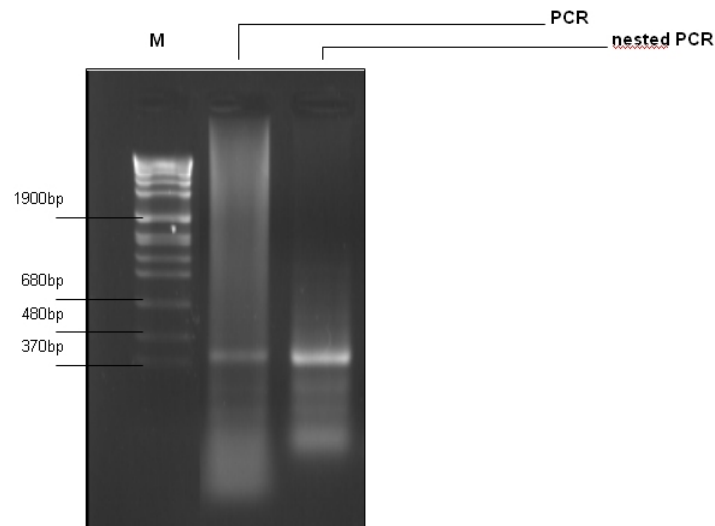


Abb. 16: Gelbild der ersten und verschachtelten PCR für pFV14.1
Spurbelegung: M = SPP1/EcoRI-Längenstandard, PCR = erste PCR (Primer P2 / P9),
 nested PCR = zweite PCR (Primer P2 / P12)

Sequenz- übereinstimmung	Sequenz- ähnlichkeit	Gen	Funktion	Art
82%	92%		phosphate permease	<i>Gibberella zeae</i> subsp. <i>graminearum</i>
80%	92%		phosphate permease	<i>Gibberella fujikuroi</i>
80%	92%		phosphate permease	<i>Fusarium oxysporum</i>
76%	91%		phosphate permease	<i>Fusarium</i> sp. IFO 7772
55%	75%	GiPT	phosphate transporter	<i>Glomus intraradices</i>
56%	74%	GvPT	phosphate transporter	<i>Glomus versiforme</i>
50%	70%		phosphate transporter	<i>Pholiota nameko</i>
48%	73%	PHO84	inorganic phosphate transporter	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
43%	66%	n.n.	inorganic phosphate transporter	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
35%	57%	JX17	phosphate transporter	<i>Oryza sativa</i>
35%	58%	PT2	phosphate transporter	<i>Sesbania rostrata</i>
38%	57%	PT2	phosphate transporter	<i>Lupinus albus</i>

Tab. 6: Ergebnis der BLASTx-Datenbankrecherche mit dem Fragment pFV 14.1
 grau hinterlegt: Phosphattransporter von *Glomus*-Arten, fett: pflanzliche Phosphattransportergene. Weitere Gene mit geringerer Sequenzübereinstimmung bzw. -ähnlichkeit waren alle pflanzlichen Ursprungs

4.2.2 Charakterisierung des *high-affinity* Phosphattransporter-Fragments pFV 14.1

Zur näheren Charakterisierung des *high-affinity* Phosphattransporter-Fragments pFV 14.1 wurde zunächst mit Hilfe des Programms Align in der Version 2000 (HEPPERLE, 2001) ein Alignment mit den oben genannten pilzlichen und pflanzlichen Phosphattransportergen- und -proteinsequenzen erstellt. In dieses Alignment wurden zusätzlich noch weitere in den Datenbanken verzeichnete Protein- und Gensequenzen von vermuteten Phosphattransportern von Pilzen, Pflanzen und Archaeobakterien integriert. Neben dem aus *Geosiphon pyriformis* amplifizierten Fragment enthielt das Alignment 12 pilzliche, 22 pflanzliche, sowie zwei Phosphattransporter aus Archaeobakterien. Das Gesamtalignment und jeweilige Auszüge der Protein- und Gensequenzen finden sich auf beiliegendem Datenträger.

4.2.2.1 Lage des Fragments und der abgeleiteten Primer im Vergleich zu anderen Phosphattransportergenen

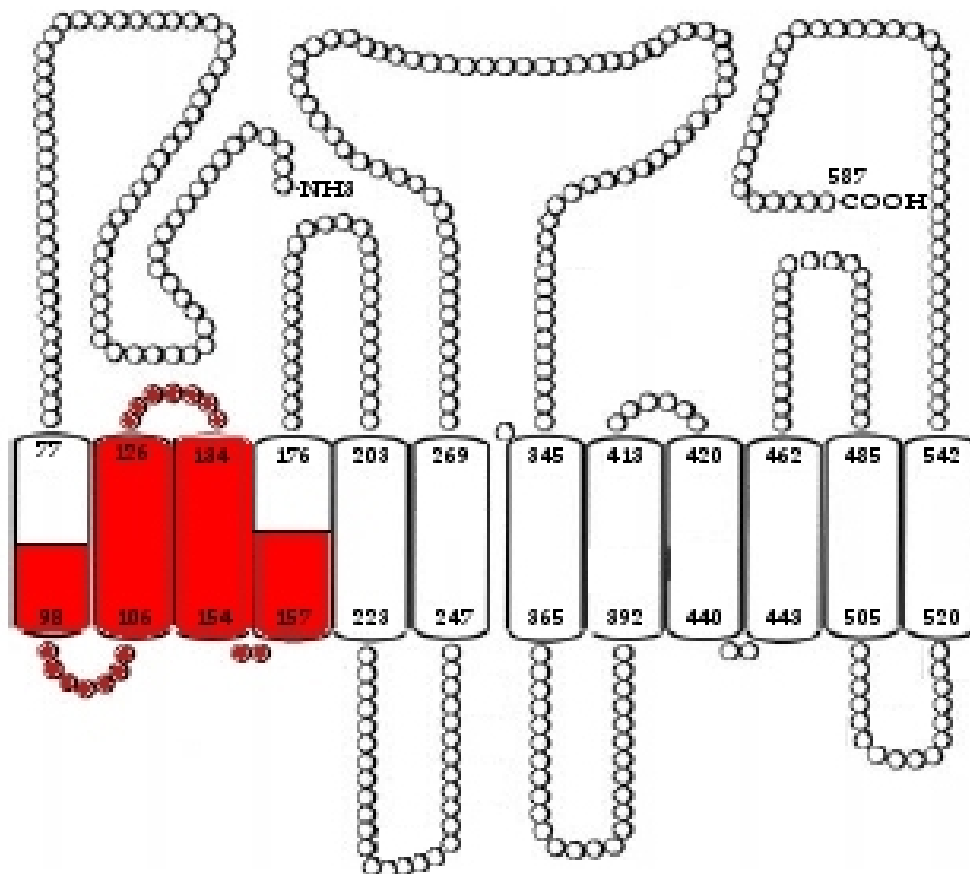


Abb. 17: Lage des Teilfragments pFV 14.1 anhand eines Strukturmodells

Modell der Sekundärstruktur des Pho84-Proteins von *Saccharomyces cerevisiae* nach BUN-YA ET. AL. (1991), verändert, basiert auf Hydropathieanalyse der abgeleiteten Pho84-Aminosäuresequenz. Die 12 vermuteten Transmembransequenzen sind als Kästen dargestellt. **Rot hinterlegt:** Amplifizierter Sequenzbereich des homologen Gens von *Geosiphon pyriformis*

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des aus dem Phosphattransportergen von *Geosiphon pyriformis* amplifizierten Fragments liegt entsprechend der abgeleiteten Pho84-Aminosäuresequenz von *Saccharomyces cerevisiae* des oben (Abbildung 17) dargestellten

Modells an Position 81–197 von insgesamt 587 Aminosäuren. Damit werden die vermuteten Transmembranbereiche 2 und 3 ganz bzw. 1 und 4 teilweise abgedeckt, wie sich auch anhand des in Abbildung 18 dargestellten Alignments der Sequenzen der Phosphattransporter von 2 *Glomus*-Arten, *Geosiphon* und Hefe zeigt. Die schwarz hinterlegten Aminosäuren stimmen mit der Sequenz aus *Glomus versiforme* überein. Es ist deutlich erkennbar, dass die abgeleiteten Proteinsequenzen aus *Geosiphon* und Hefe deutlich mehr Aminosäureaustausche haben als die beiden *Glomus*-Arten untereinander. Zusätzlich sind die Sequenzen der drei *Glomeromycota* gegenüber der Hefesequenz um einige Aminosäuren kürzer, was im Alignment durch Lücken (Gaps) dargestellt ist.

Acc-Nr.	Art	Gen	81	91	101	111	121
AF359112	<i>G. versiforme</i>	GvPT	MDAYDLFAIN	FASTMIGYVY	YGGKTPAN--	IDLGLKVSGS	IGTLLGQLFF
U38650	<i>G. intraradices</i>	GiPT1	MDAYDLFAVN	FASTMIGYVY	YGGKTPAN--	IDLGLKVTGS	IGTLLGQLFF
GeoPT	<i>G. pyriformis</i>	GeoPT	MDAYDLFTAS	MLTIMLGIIVY	YBGTGKMPAS	SDNAIKLATS	AGTVVGQLGF
D90346	<i>S. cerevisiae</i>	PHO84	TSYDIFAIN	LGITMMSYVY	WHG--SMPGP	SQTLTKVSTS	VGTVIQQFGE
	131	141	151	161	171	181	191
AF359112	GYLADRLGRK	KMYGVELMII	IVATVASSLA	GQSRVTVVG	-----I	IMFWRVVMGV	GIGGDYP
U38650	GYLADRLGRK	RMYGVELMTI	IVATVASALS	GSRAVTVVG	-----T	IMFWRVIMGV	GIGGDYP
GeoPT	GMLADIVGRK	RMYGLELMVI	IVASLAQSIT	AGGPVVDIVG	-----L	IIFWRVIMGI	GIGGDYP
D90346	GTLADIVGRK	RIYGMELIIM	IVCHILQTTV	AHSPAINFVA	HSPAINFVAV	LTFYRIVMGI	GIGGDYP

Abb. 18: Vergleich der Proteinsequenzen der Phosphattransporterfragmente
 schwarz hinterlegt: mit der Sequenz von *Glomus versiforme* übereinstimmende Aminosäuren, Nummer der Aminosäuren entsprechen dem Gen PHO84 von *Saccharomyces cerevisiae*. „-“ = Gap (künstlich eingefügte Lücke)

4.2.2.2 Mögliches Intron von 58 bp

Bereits im Alignment konnte erkannt werden, dass das Fragment eine 58 bp lange Sequenz enthielt, die mit keiner anderen bisher charakterisierten mRNA-Sequenz übereinstimmte. Diese ist in Abbildung 19 dargestellt. Da dieser Sequenzabschnitt außerdem im Leseraster um ein Basenpaar verschoben ist, liegt der Schluß nahe, dass es sich dabei möglicherweise um ein Intron handelt. Die genaue Bestimmung, ob diese Sequenz tatsächlich ein Intron darstellt, erwies sich jedoch als unsicher. Da *Saccharomyces cerevisiae* nur vereinzelt Introns besitzt und es sich bei den beiden Sequenzen der *Glomus*-Arten um Sequenzen aus cDNA-Genbanken handelt, also Introns bereits durch Splicing aus der Prae-mRNA ausgeschnitten wurden, konnte aufgrund des Sequenzvergleichs keine Aussage getroffen werden. Typische Splicing-Motive innerhalb der Gensequenz aus *Geosiphon pyriformis* waren ebenfalls nicht nachzuweisen, jedoch würde die Transkription innerhalb dieser 58 bp in jedem der drei möglichen Leserahmen zu einem Stop-Codon führen. Schneidet man das Fragment jedoch aus, lässt sich der offene Leserahmen „in frame“ weiter ablesen.

GeoPT-PRO	-----	M--D--A--Y	--D--L--F--	-T--A--S--	M--L--T--I	--M--L--G--	-I--V--Y--
GeoPT	-----	tt atggatgcgt	atgatctggt	cactgcctct	atgctgacca	tcatgctggg	tattgtctat
GiPT1	cggctttttt	atggacgcgt	acgatctttt	tgctatcaat	tttgctctca	ctatgatagg	gtacgtctat
GvPT	tggctttttt	atggacgcgt	acgatctttt	tgccgtcaat	tttgcttcca	ctatgattgg	gtacgtctat
PHO84	tggtttcttg	acagattctt	atgataattt	tgccattaat	ttgggtatca	ctatgatgtc	ctacgtttac
GeoPT-PRO	Y--P--G--T	--G--K--M--	-P--A--S--	S--D--N--A	--I--K--L--	-A--T--S--	A--G--T--V
GeoPT	taccctggca	ctggaaagat	gcctgcttcc	tctgacaatg	ccatcaagct	ggccacctct	gctgggtaccg
GiPT1	tatgggtgta	aaactcctgc	aaat-----	atcgacttgg	gtttgaaagt	gtcagggttct	attggcactt
GvPT	tatggcggtg	aaacaccagc	aaat-----	attgacttgg	gtctgaaggt	gacagggttct	attggcactt
PHO84	tggcacggt-	-----agtat	gccagggtcca	agtcaaacct	tggtgaaggt	ttccacttct	gttgggtactg
GeoPT-PRO	--V--G--Q--	-L--G--F--	G--M--L--A	--D--I--V--	-G--R--K--	R--M--Y--G	--L--E--L--
GeoPT	ttgttggtca	gctagggttc	ggtatgcttg	cggatattgt	cggacgtaag	cgcattgtacg	gtcttgagct
GiPT1	tacttggtca	attatttttc	ggttatttgg	cagatcgctc	tgggagaaaag	aagatgtatg	gtgttgaatt
GvPT	tacttggtca	attatttttc	ggatatttgg	ctgatcgctc	tgggagaaaag	aggatgtatg	gtgttgaatt
PHO84	ttatttggtca	atttggtttt	ggtacttttag	ctgatattgt	tggtcgtaag	agaatttatg	gtatggaact
GeoPT-PRO	-M--V--I--	I--F--A--S	--L--A--Q--	-S--L--T--	A--G--G--P	--A--V--D--	-I--V--G--
GeoPT	catgggtatc	atctttgcct	ctcttgccca	gtctcttact	gccggtggcc	ctgccgtcga	cattgttggg
GiPT1	aatgatcatt	attggtgcga	cagttgcttc	atcggtggcc	gggtcaaagtc	gtgctgttac	agtagtcggt
GvPT	aatgatcatt	attggtgcga	cagttgcttc	tgcggtgtcc	gggtgaaagtc	gtgctgttac	agtagtcggt
PHO84	tattatcatg	attgtctgta	ccattctgca	aaccactggt	gctcattctc	ctgcatttaa	cttcggttgct
GeoPT-PRO	-----	-----	-----L--	I--I--F--W	--R--V--	-----	-----
GeoPT	-----	-----	-----ctc	atcatcttct	ggcgtgtaAG	TCTCGCTGCG	ACCTCCCACA
GiPT1	-----	-----	-----att	atcatgtttt	ggcgtggt--	-----	-----
GvPT	-----	-----	-----acc	atcatgtttt	ggcgtgta--	-----	-----
PHO84	cattctcctg	ctattaactt	cggtgtggtt	ttaacattct	accgtatt--	-----	-----
GeoPT-PRO	-----	-----	-----	-----I--M	--G--I--G--	-I--G--G--	D--Y--P--
GeoPT	CCCTTTTCCG	GCACTAATTG	GAGAAAAAGA	CAGGTCatca	tgggcatcgg	cattggaggt	gactacccc-
GiPT1	-----	-----	-----	-----gtaa	tgggtgtcgg	tattggagga	gattatcctc
GvPT	-----	-----	-----	-----ataa	tgggtgtcgg	tattggagga	gattatcccc
PHO84	-----	-----	-----	-----gtca	tgggtattgq	tatcggtggt	gactacccac

Abb. 19: Alignment von pFV14.1 (GeoPT)

Abkürzungen bedeuten: GeoPT-PRO - abgeleitete Aminosäuresequenz des Fragments pFV14.1, GeoPT - *Geosiphon pyriformis* Phosphatransporter (Fragment pFV14.1), GiPT1 - *Glomus intraradices* Phosphatransporter 1 (cDNA-Sequenz), GvPT - *Glomus versiforme* Phosphatransporter (cDNA-Sequenz), PHO84 - Phosphatransporter Pho84 aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Schwarz hinterlegt: mögliches Intron von 58 bp

4.2.2.3 Phylogenetische Analyse des Fragments

Um eine genauere Aussage über die Zuordnung des Genfragments insbesondere bezüglich der phylogenetischen Distanz zu den ähnlichen Sequenzen der *Gibberella*- bzw. *Fusarium*-Arten treffen zu können, wurde mit den in die Aminosäuresequenz übersetzten Gensequenzen der im Alignment vertretenen Genabschnitte aus 37 Arten sowohl eine Maximum-Parsimony- als auch eine Neighbor-Joining-Analyse berechnet. Zur statistischen Absicherung wurden dabei jeweils 1000 Bootstraps vorgenommen. Die berechneten phylogenetischen Bäume wurden mit der „Consense“-Funktion des Programmpakets PHYLIP (FELSENSTEIN, 1989) in einen Konsensusbaum übersetzt und mit Hilfe des Programms Treeview (PAGE, 1996) grafisch dargestellt. Als Außengruppe wurden die beiden Sequenzen des Archaeobakteriums *Sulfolobus solfataricus* verwendet. Da das letztgenannte Programm nur die Accessions-Nummer der Sequenzen darstellt, wurde die Grafik in CorelDRAW 9.0 nachbearbeitet und die Artnamen sowie die Namen der Proteine bzw. Gene eingefügt. Der so bearbeitete phylogenetische Baum ist in Abbildung 20 dargestellt, dabei wurde die Wahrscheinlichkeit einer Verzweigung nach der Maximum-Parsimony-Analyse über und die aus der Neighbor-Joining-Analyse unter der jeweiligen Verzweigung angegeben. Bei Wahrscheinlichkeiten unter 60% wurden die Gruppen auf eine Ebene gesetzt, da in diesem Fall nicht von einer abgesicherten Trennung ausgegangen werden kann.

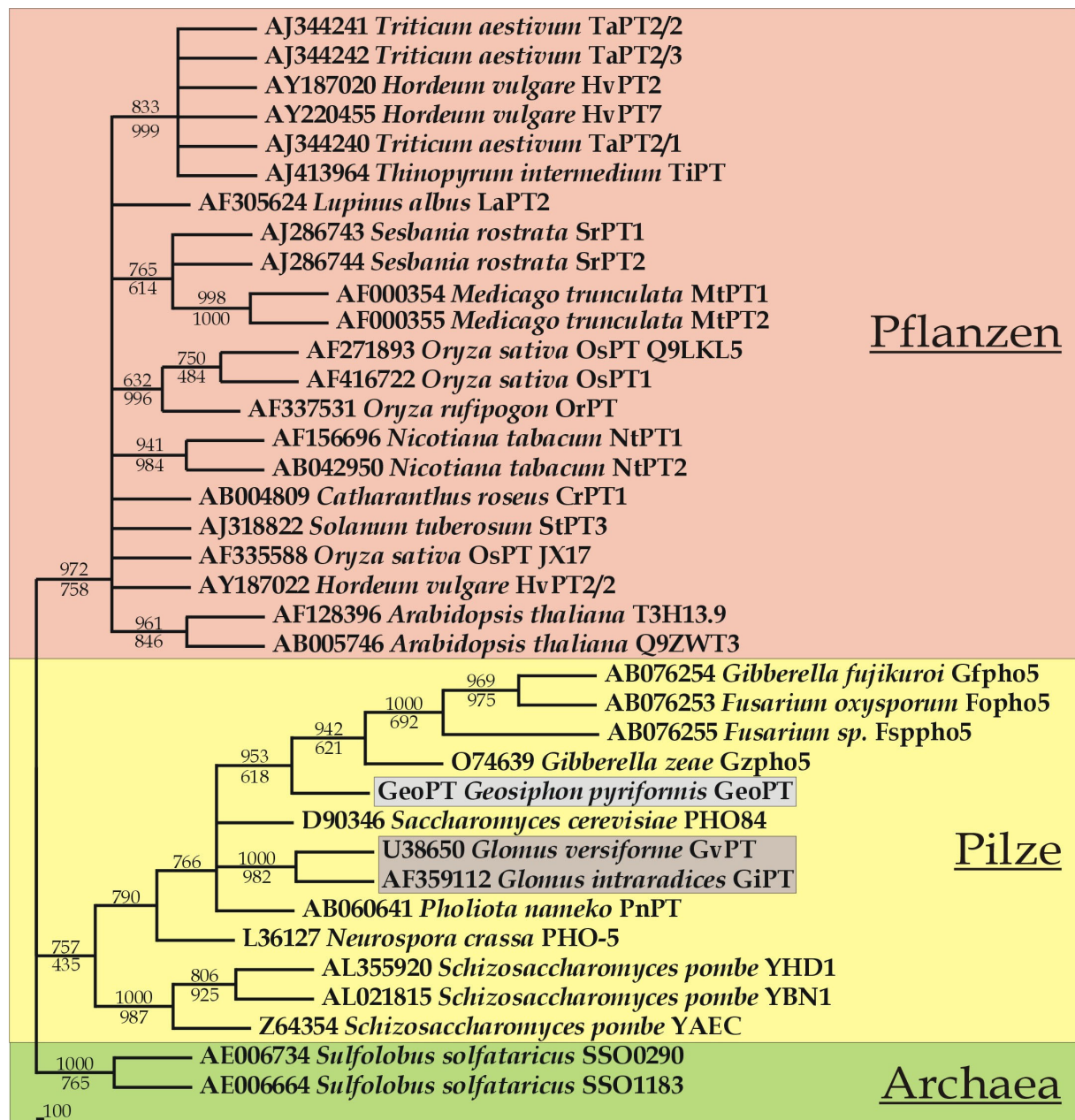


Abb. 20: Phylogenetische Beziehung des Fragments aus *Geosiphon pyriformis* zu anderen P_i -Transportern

Phylogenetische Analyse von *high-affinity* Phosphattransportproteinen aus Pilzen und Pflanzen. Berechnung mit 1000 bootstraps, Abzweigungswahrscheinlichkeiten unter 60 % wurden nicht aufgelöst. Über der Abzweigung: Wahrscheinlichkeit aus Maximum-Parsimony-, darunter die aus Neighbor-Joining-Analyse grau hinterlegt: Fragment aus *Geosiphon pyriformis* bzw. cDNA-Fragmente aus 2 *Glomus*-Arten

Die translatierten Proteinsequenzen im oben aufgeführten phylogenetischen Baum wurden mit zwei Phosphattransportersequenzen von Archaeobakterien als Außengruppe berechnet. Es zeigte sich, dass sich die drei großen Gruppen der Phosphattransporter von Archaeobakterien, Pflanzen und Pilzen deutlich voneinander abgrenzten. Innerhalb der Pilze wurden in der Maximum-Parsimony-Analyse drei Sequenzen der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* mit hoher Wahrscheinlichkeit von allen anderen pilzlichen Proteinfragmenten abgetrennt. An der nächsten Verzweigung des phylogenetischen Baumes trennte sich die Sequenz des *high-affinity* Phosphattransporters von *Neurospora crassa* mit ebenfalls hoher Wahrscheinlichkeit ab. Aufgrund der geringen statistischen Unterstützung

war die Auftrennung der übrigen Phosphattransportersequenzen in vier Gruppen darzustellen, die in der Neighbor-Joining-Analyse jeweils geringer unterstützt waren als in der Maximum-Parsimony-Analyse: Die einzelnen Proteinsequenzen von *Pholiota nameko* und *Saccharomyces cerevisiae* – als Vertreter zweier Gruppen zu werten – spalteten sich von den beiden Sequenzen aus *Glomus*-Arten und einer vierten Gruppe mit *Gibberella*- und *Fusarium*-Arten ab. Basal im letztgenannten Zweig stand dabei, mit 94,2 %iger (62,1 %) Wahrscheinlichkeit klar von den *Gibberella*- und *Fusarium*-Arten getrennt, die Sequenz von *Geosiphon pyriformis*. Die genetische Distanz zur PHO84-Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* ist dabei ebenso groß wie zu den genannten *Gibberella*- und *Fusarium*-Sequenzen. Aufgrund der hohen Unterstützung der Abtrennung kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Genfragment nicht um ein Amplifikat einer Kontamination mit anderer Pilz-DNA handelt, sondern tatsächlich um einen Phosphattransporter aus *Geosiphon pyriformis*.

4.3 Molekularbiologische Charakterisierung bakterieller Gene

4.3.1 Grund für die Untersuchung von bakteriellen Genen

Um den *high-affinity* Phosphattransporter des Pilz-Partners von *Geosiphon pyriformis* aus der genomischen DNA-Genbank zu isolieren, wurden unter anderem auch direkte PCRs (vgl. 3.2.13.3.4 und 4.1.4) mit der Genbank als Template durchgeführt. Ein Schema dieser Reaktionen ist in Abbildung 21 dargestellt.

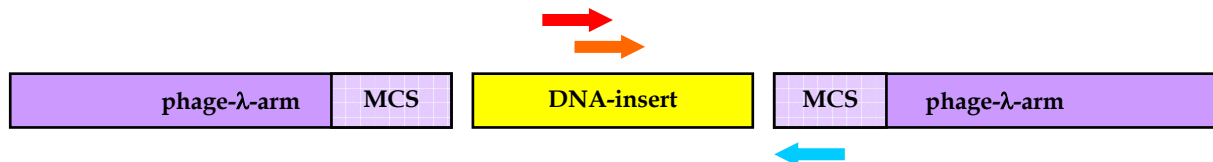


Abb. 21: Schema der direkten PCR aus der genomischen DNA-Genbank von *Geosiphon pyriforme*
verwendete Primer: rot = P18-HG, orange = P16-HG, blau = Sequenzierprimer T3

Auf diese Weise sollte versucht werden, mit einem genspezifischen Primer, dessen Bindestelle im bekannten Bereich des DNA-Inserts lag, und einem Standard-Sequenzierprimer, mit einer Bindestelle in der multiplen Klonierungsstelle des Phagen-Vektors, Teile des Phosphattransporters zu isolieren. Da diese Reaktion nur auf einer Seite spezifisch war, wurde eine zweite, verschachtelte PCR durchgeführt, in der ein anderer, stromabwärts gelegener genspezifischer Primer eingesetzt wurde. Dabei konnte unter anderem ein Fragment pFV 40.1 isoliert und kloniert werden, das nach Vergleich mit Gen- bzw. Proteindatenbanken hohe Ähnlichkeit mit einem bakteriellen Zuckertransporter vom ABC-Typ aus dem *agl*-Operon von *Sinorhizobium meliloti* zeigte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt:

Sequenz- übereinstimmung	Sequenz- ähnlichkeit	Gen	Funktion	Art
80%	86%	<i>aglF</i>	inner membrane permease, α -glucoside transport system	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
39%	56%	<i>PH1038</i>	hyp. ABC-transporter protein	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
33%	57%	<i>PH1215</i>	hyp. ABC-transporter protein	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
31%	47%	<i>lacF</i>	inner membrane permease, lactose transport system	<i>Agrobacterium radiobacter</i>

Tab. 7: Ergebnis der BLASTx-Datenbankrecherche mit dem Fragment pFV 40.1

Die Tatsache, in einer Genbank, die ausschließlich pilzliche DNA-Fragmente enthalten sollte, auch bakterielles Genmaterial zu finden, führte zu der Frage, ob dieses aus bakteriellen Kontaminationen des zum Aufbau der Genbank verwendeten Sporenmaterials stammen könnte. Eine weitere Möglichkeit des Ursprungs stellen BLOs dar, bacteria-like organisms, die in Sporen und Hyphen des Pilz-Partners von *Geosiphon pyriformis* vorkommen. Diese BLOs sind aus anderen AM-Pilzarten bereits seit längerem bekannt (SWARD 1981A, B, C; MACDONALD ET AL. 1982; MEIER & CHARVAT, 1992) und in *Geosiphon* durch SCHÜßLER ET AL. (1994) elektronenmikroskopisch nachgewiesen (vergl. Abbildung 22). Letztgenannte zeigen einen Durchmesser von ca. 0,5 μm und sind von einer Membran umgeben. Eine weitere, ursprünglich vom Wirt stammende Membran ist nicht vorhanden. Bei BLOs, die von BIANCIOTTO ET AL. (1996) in dem AM-Pilz *Gigaspora margarita* untersucht wurden, gelang der Nachweis, dass es sich um lebende Bakterien handelt, die dazu in der Lage sind, sich zu teilen, ihre Zahl wurde mit ca. 250.000 pro Spore angegeben. Durch Charakterisierung des 16 S rRNA-Gens als molekularer Marker konnten im Rahmen derselben Arbeit 1423 bp sequenziert und ein phylogenetischer Stammbaum berechnet werden. Die bakteriellen Endosymbionten von *Gigaspora margarita* wurden dabei in die Pseudomonaden der Gruppe II eingeordnet, die zur β -Unterklasse der Proteobakterien gehören. Eine evolutionäre Abtrennung der *Gigaspora*-BLOs von freilebenden *Burkholderia*-Arten, die als nächste Nachbarn im phylogenetischen Baum standen, wurde auf ca. 125 bis 250 Millionen Jahre datiert. Nach Isolation weiterer 16 S-rRNA Gensequenzen aus Isolaten von *Scutellospora persica* und Teilsequenzen aus *S. castanea*, *Gigaspora rosea*, *G. gigantea* und *G. decipiens* (BIANCIOTTO ET AL., 2000) wurden diese bakteriellen Endosymbionten aus AM-Pilzen der Familie *Gigasporaceae* von BIANCIOTTO ET AL. (2003) als „*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*“ gen. nov., sp. nov. als gram-negative stäbchenförmige Bakterien beschrieben, die 0,8-1,2 x 1,5-2,0 μm groß sind und einzeln oder in Gruppen von einer Vakuolenmembran umhüllt vorliegen.

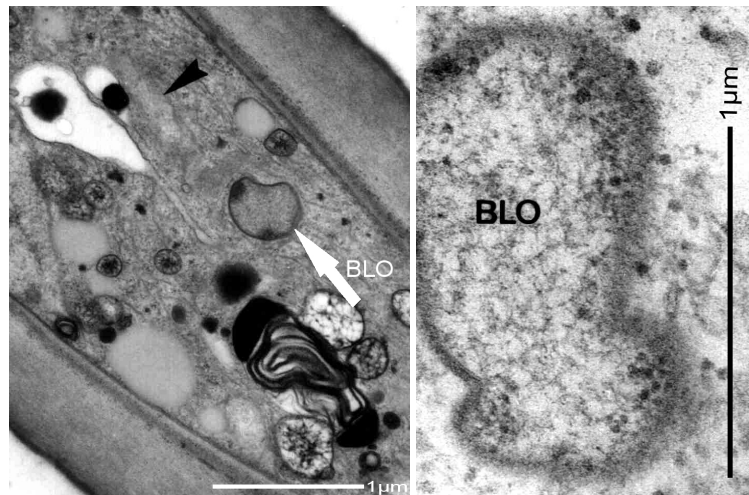


Abb. 22: BLOs in *Geosiphon pyriformis* (verändert aus SCHÜßLER & KLUGE, 2001)

In der im Rahmen dieser Dissertation angeleiteten Diplomarbeit von Stefan Weinhardt (WEINHARDT, 2001) sollte nun überprüft werden, ob das sequenzierte Teilstück eines bakteriellen Hexosetransportergens eindeutig den BLOs zugeordnet werden kann und diese bakteriellen Endosymbionten gleichzeitig mit der Sequenz des 16 S rRNA-Gens als eines molekularen Markers phylogenetisch eingeordnet werden.

4.3.2 Vermeidung von Kontaminationen bei der Charakterisierung bakterieller Gene aus „bacteria-like organisms“ (BLOs) aus Sporen von *Geosiphon pyriformis*

Bereits zu Beginn der Arbeiten zur Charakterisierung bakterieller Gene aus den bacteria-like Organisms (BLOs) aus dem Cytoplasma von *Geosiphon pyriformis* wurde klar, dass ein großer Aufwand betrieben werden muß, um Luftkeime oder Kontaminationen durch Fremd-DNA zu vermeiden. Zur phylogenetischen Einordnung der bakteriellen Endosymbionten sollten 16 S rRNA-Gene mit universellen Primern amplifiziert werden. Natürlich wäre auch jede Kontamination mit bakterieller DNA ein mögliches Template für die Amplifikation dieses Markergens. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zur im Material- und Methodenteil beschriebenen DNA-Isolation alle Arbeiten, die zur Gewinnung von DNA und zur Vorbereitung der anschließenden Experimente dienten, unter der Sterilbank ausgeführt. Es wurden Einmalhandschuhe und Mundschutz verwendet, alle Geräte, Reaktionsgefäße und auch die Handschuhe wurden mit einer 3 %igen H_2O_2 -Lösung abgerieben, um ggf. vorhandene Luftkeime abzutöten und ihre DNA oxidativ zu zerstören. Einzelsporen von *Geosiphon pyriformis* wurden mit frisch angesetzter 4 %iger Chloramin T-Lösung 20 min lang oberflächensterilisiert, anschließend DNA isoliert und in PCR-Reaktionen eingesetzt.

4.3.3 Nachweis des bakteriellen Ursprungs der charakterisierten Gene

Um den bakteriellen Ursprung der charakterisierten Gensequenzen nachzuweisen, wurde jeder DNA-Isolutionsansatz in zwei gleiche Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte wurde in einer PCR mit universellen Primern für das bakterielle 16 S rRNA-Gen eingesetzt, um ggf. mittels charakterisierter Gensequenzen die BLOs von *Geosiphon pyriformis* phylogenetisch einordnen zu können. Die andere Hälfte wurde für eine zweite PCR mit Primern benutzt, die für die aus der Genbank amplifizierte und bereits charakterisierte Hexosetransportersequenz

spezifisch waren. Zusätzlich zur genannten doppelten Versuchsführung wurden bei allen PCR-Reaktionen für das 16 S rRNA-Gen Negativkontrollen mitgeführt, die alle Bestandteile einer PCR-Reaktion, jedoch kein DNA-Template enthielten. Beispielhaft ist das Ergebnis für eine dieser parallelen PCR-Ansätze in Abbildung 23 dargestellt. Gel A zeigt dabei die Amplifikation des 16 S rRNA-Gens, die beiden weiteren Gele B und C zeigen die Plasmid-Minipräparation der dazugehörigen klonierten Hexosetransporterfragmente.

War aus einer DNA-Isolation die Amplifikation des 16 S rRNA-Gens, nicht aber die des Hexosetransporterfragments möglich, so lieferte ein Vergleich der amplifizierten 16 S rRNA-Genfragmente mit Datenbanken (BLAST-Homology Search auf der Webseite des NCBI, [HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV]) eine hohe Übereinstimmung (über 99 %) der Gensequenz zum 16 S rRNA-Gen von ubiquitär verbreiteten Bakterienarten wie *Staphylococcus*, *Pseudomonas* und anderen typischen Bodenbakterienarten. 16 S rRNA-Genamplifikationen mit erfolgreicher Amplifikation des Hexosetransporters zeigten hohe Ähnlichkeit zu nicht-identifizierten bzw. nicht kultivierbaren Bakterien.

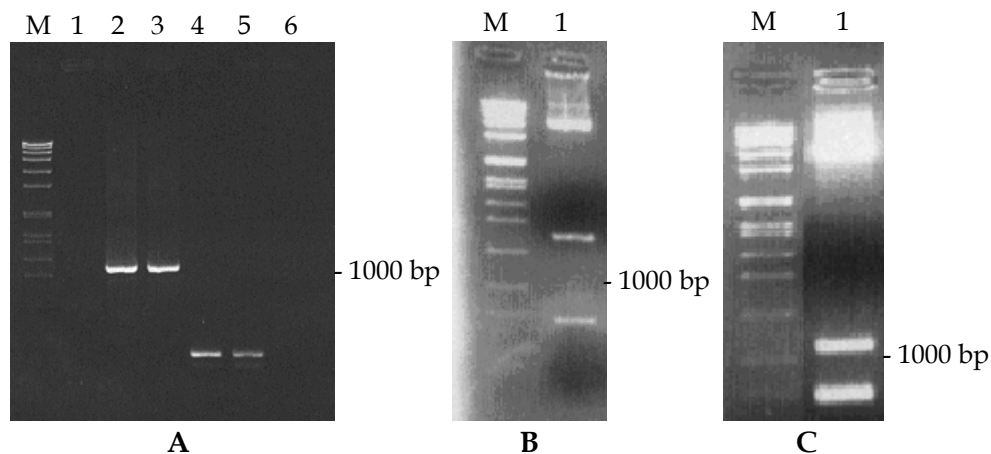


Abb. 23: Gelbilder einer parallelen PCR für das 16S-rRNA- und Hexosetransportergen (A), Minipräparationen der 16S rRNA-Genfragmente pStW 19.1 (B) und pStW 19.2 (C)

Spurbelegung Gel A: M = 100 bp-Leiter, 1 = 16 S-Negativkontrolle, 2 = 16 S aus unsterilisierten Sporen, 3 = 16 S aus sterilisierten Sporen, 4 = *aglF* aus unsterilisierten Sporen, 5 = *aglF* aus sterilisierten Sporen, 6 = *aglF*-Negativkontrolle;

Spurbelegung Gel B: M = 100 bp-Leiter, 1 Minipräp von Klon pStW 19.1 (*EcoRI*)

Spurbelegung Gel C: M = 100 bp-Leiter, 1 Minipräp von Klon pStW 19.2 (*EcoRI*)

4.3.4 Phylogenetische Einordnung der BLOs von *Geosiphon pyriforme* mit dem 16 S-rRNA Gen als molekularem Marker

Für die Sequenzanalyse wurden die amplifizierten und sequenzierten Fragmente des 16 S rRNA-Gens einer Neighbor-Joining-Berechnung mit 1000 Bootstraps unterworfen. Aus den daraus berechneten 1000 Bäumen wurde ein Consensusbaum erstellt, der die Wahrscheinlichkeit widerspiegelt, dass eine Abzweigung an der angegebenen Stelle tatsächlich vorhanden ist. Zur Erstellung der Analyse wurden drei Sequenzen von Archaeobakterien als Außengruppe verwendet. Das der Berechnung zugrunde liegende Sequenzalignment enthält einige Cyanobakteriensequenzen, um ggf. auftretende Kontaminationen durch an der Sporenoberfläche von *Geosiphon pyriformis* anhaftende *Nostoc*-Zellen zuordnen zu können. Da aufgrund der bereits vorliegenden Analyse der BLOs von *Gigaspora margarita* eine Einordnung der bakteriellen Endosymbionten in die Gruppe der β -

Proteobakterien wahrscheinlich war, wurden die Untergruppen der β -Proteobakterien im besonderen Maße in das Sequenzalignment einbezogen. Zusätzlich wurden noch einige γ -Proteobakterien- und Eubakteriensequenzen im Alignment verwendet.

In Abbildung 24 ist der berechnete Konsensusbaum gezeigt. Die vorliegenden Sequenzen, die aus Sporen von *Geosiphon pyriformis* amplifiziert wurden, gliedern sich dabei in zwei scharf getrennte Gruppen auf. Hier zeigte sich, dass der hohe Aufwand zur Vermeidung von Kontaminationen gerechtfertigt war, denn eine Gruppe von Amplifikaten steht dabei mit großer statistischer Unterstützung in der Gruppe der γ -Proteobakterien, bzw. dazu unmittelbar benachbart in den β -Proteobakterien in der Gruppe der *Neisseriaceae* bzw. in der *Rhodocyclus*-Gruppe (vgl. Abbildung 24, rot hinterlegte Fragmente im unteren Drittel). Die Stellung der letztgenannten Teilsequenzen war allerdings statistisch nicht abgesichert. Die hier gruppierten 16 S-Fragmente waren allesamt potentiell als Kontaminanten eingestufte Amplifikate, da aus der parallelen PCR mit für das Hexosetransporter gen spezifischen Primern keine Amplifikation erfolgte.

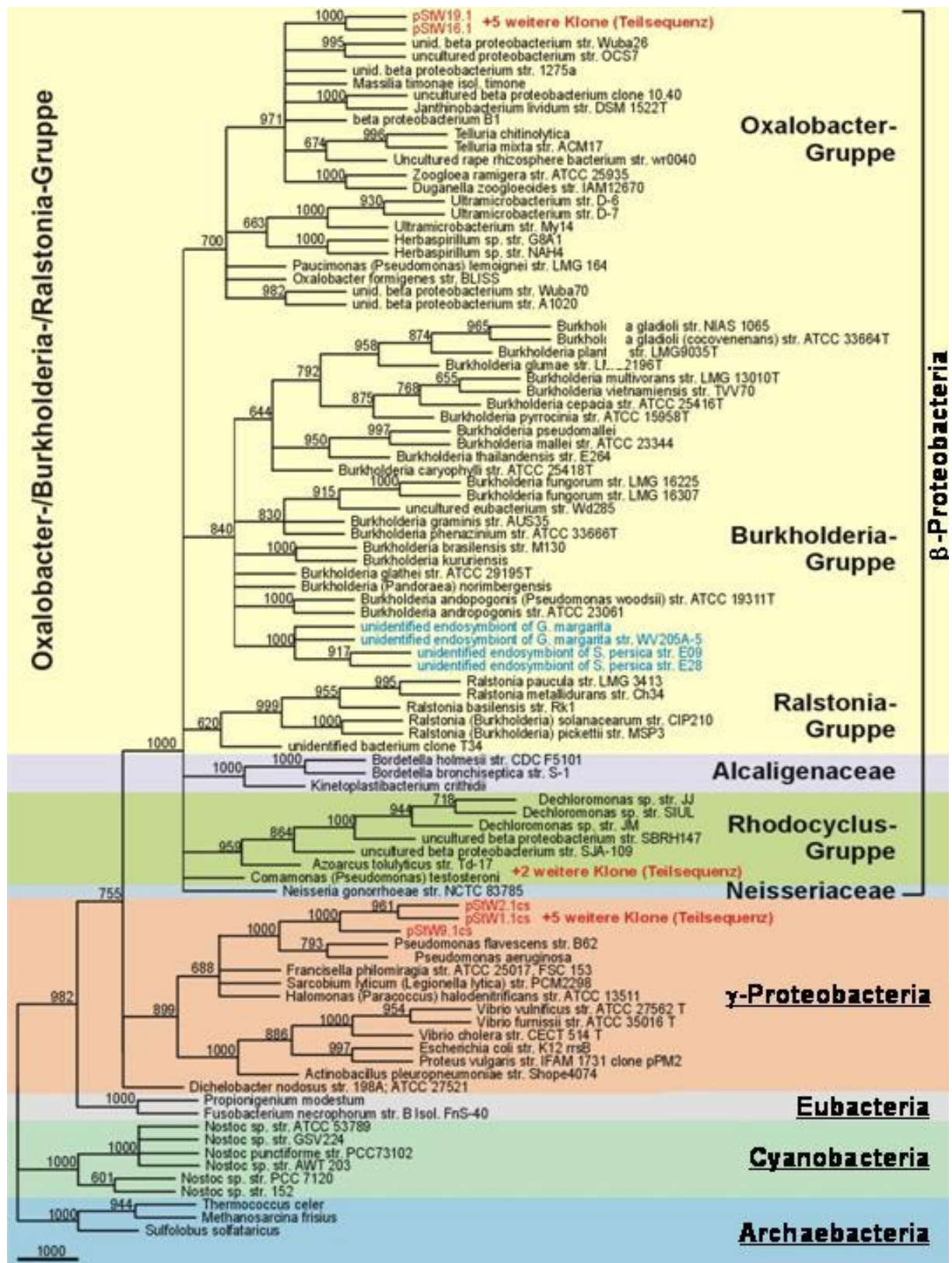


Abb. 24: phylogenetische Einordnung der 16S-rRNA-Gensequenz aus *Geosiphon pyriforme*
 Consensus-Baum aus einer Neighbor-Joining-Analyse mit 1000 Bootstraps, die Wahrscheinlichkeit einer Verzweigung ist auf den Ästen angegeben, **Außengruppe:** 3 Sequenzen von Archaeobakterien,
blau: 16 S rRNA-Gensequenzen der BLOs von *Gigaspora margarita* bzw. *Scutellospora persica*,
rot: 16 S rRNA-Gensequenzen aus Sporen von *Geosiphon pyriformis*, potentielle Kontaminanten in der unteren Gruppe

Eine weitere Gruppe von Fragmentsequenzen gruppiert sich mit ebenfalls hoher statistischer Absicherung in der *Oxalobacter*-Gruppe der β -Proteobakterien (vgl. Abbildung 24, oben im Bild). Es sind dies die 16 S rRNA-Gensequenzen, bei denen es möglich war, aus demselben DNA-Isolationsansatz auch das Hexosetransporter-Gen zu amplifizieren. Durch diese PCR-Amplifikation zweier Gene aus demselben DNA-Isolationsansatz konnte der Nachweis geführt werden, dass es sich bei den 16 S-Fragmenten um Sequenzen aus demselben DNA-Pool handelt, der auch das zu einem Zuckertransporter homologe Gen enthält. Diese PCR wurde nicht - wie die Amplifikation des 16 S rRNA-Gens - mit universellen, sondern mit für das bereits bekannte Genfragment spezifischen Primern durchgeführt und die amplifizierten Genfragmente wurden durch mehrfache, unabhängige Sequenzierung immer wieder nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den Sequenzen der Fragmente aus *Geosiphon pyriformis* finden sich die 16 S rRNA-Gensequenzen der bakteriellen Endosymbionten der AM-Pilzarten *Gigaspora margarita* und *Scutellospora persica*, die von BIANCIOTTO ET. AL. (1996) charakterisiert wurden, ebenfalls mit 1000 Bootstraps abgesichert innerhalb der *Burkholderia*-Gruppe der β -Proteobakterien. Dies bedeutet eine nicht unerhebliche genetische Distanz zwischen den bakteriellen Endosymbionten aus *Gigaspora* bzw. *Scutellospora* auf der einen und denselben aus *Geosiphon* auf der anderen Seite (vgl. Abbildung 24, Bildmitte). Das der Berechnung zugrunde liegende Sequenzalignment mit zusätzlichen Strukturinformationen findet sich als Datei im rtf-Format auf dem beiliegenden Datenträger.

4.3.5 ABC-Typ Hexosetransporter

Wie unter 4.3.1. bereits näher ausgeführt, konnte aus einer genomischen DNA-Genbank durch nested-PCR mit jeweils einem für ein Phosphattransporter-Gen spezifischen Primer auf der einen und einem Standard-Sequenzierprimer auf der anderen Seite ein 465 bp langes Teilstück eines Gens amplifiziert werden, das im Vergleich mit in Datenbanken gespeicherten Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit mit einem Hexosetransporter-Homolog vom ABC-Typ aus dem α -Glucosid-Transportsystem (agl-Operon) von *Sinorhizobium meliloti* aufweist. Ein Modell dieses Operons ist in Abbildung 25 dargestellt.

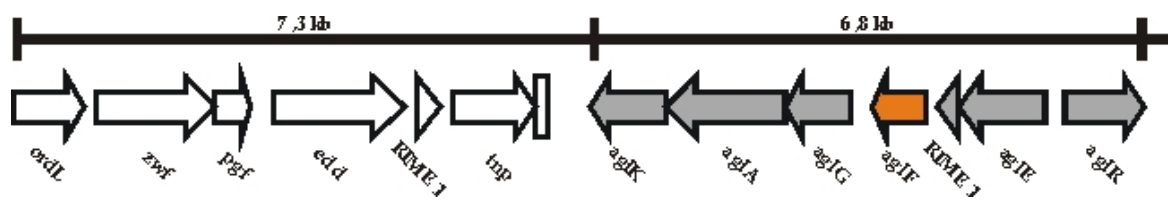


Abb. 25: agl-Operon von *Sinorhizobium meliloti*

nach WILLIS & WALKER, 1999, verändert

ordL = Oxidoreduktase, zwf = Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, pgf = 6-Phosphogluconolactonase,
edd = 6-Phosphogluconat Dehydratase (zwf, pgf und edd sind Gene des Enter-Doudoroff-Stoffwechselweges),
RIME1 = *Rhizobium*-spezifisches Mosaikelement (repeat-Element),
tnp = inaktive Transposase (flankiert von 39bp terminalen invertierten Repeats)

aglK = ATP-hydrolysierendes peripheres Membranprotein (ATP-binding cassette family), aglA = α -Glucosidase-Homolog, aglG = Homolog zu einer Zucker-Permease an der inneren Membran, aglF = Homolog zu einer Zucker-Permease an der inneren Membran, RIME1 = *Rhizobium*-spezifisches Mosaikelement (repeat-Element), aglE = Homolog zu einem periplasmatischen (solute-) Bindeprotein, aglR = regulatorisches Protein (DNA binding protein, lacI-Repressor-Familie)

Für dieses Genstück wurden spezifische Primer entworfen und versucht, durch PCR mit aus einzelnen, oberflächensterilisierten Sporen isolierter DNA als Template dieses Genstück zu amplifizieren. Die Spezifität der entworfenen Primer konnte weiter oben (vgl. 4.3.3) bereits gezeigt werden.

Zur Vervollständigung der Gensequenz des bakteriellen ABC-Typ-Hexosetransporters wurde versucht, mit auf PCR beruhenden „chromosome-walking“-Techniken (vgl. 3.2.5.3.2) weitere das bekannte Genfragment flankierende Sequenzen zu amplifizieren und zu charakterisieren. Dabei wurden die inverse PCR nach OCHMAN ET AL. (1988) und die supported PCR nach RUDENKO ET AL. (1993) angewendet. Beide Methoden führten jedoch – wenn überhaupt – nur zur Amplifikation unspezifischer Genfragmente.

4.4 Untersuchungen zur Aufnahme und Metabolisierung von anorganischem Phosphat durch *Geosiphon pyriformis*

Wegen der sehr geringen für die Experimente zur Verfügung stehenden Mengen an Blasenmaterial von *Geosiphon pyriformis* war eine besonders empfindliche und dabei leicht handhabbare Methode erforderlich, um die Aufnahme von Phosphat durch *Geosiphon* aus der Umgebung und seine Umsetzung im Stoffwechsel untersuchen zu können. Dabei bot sich die Anwendung von radioaktivem Phosphat ($^{32}\text{P}_i$) als Tracer an. Die Auftrennung und Quantifizierung markierter Verbindungen sollte mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und anschließender Autoradiographie der Chromatogramme erfolgen. Diese Methode wurde von FEIGE ET AL. (1969) eingeführt und u. a. von KLUGE ET AL. (1970) und BECKER ET AL. (1971) in pflanzenphysiologischen Untersuchungen angewandt. Die Quantifizierung der Radioaktivität in den einzelnen Flecken erfolgte, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, durch Flüssigkeitsszintillationszählung. Zu Vergleichszwecken wurden die Experimente unter gleichen Bedingungen sowohl an intakten Blasen von *Geosiphon pyriformis* als auch an freilebenden Zellen von *Nostoc punctiforme* durchgeführt. Es wurde hier ein Cyanobakterienstamm verwendet, der früher aus Blasen von *Geosiphon pyriformis* isoliert wurde.

Obwohl in der Literatur schon früher postuliert wurde, dass - ähnlich wie die die arbuskuläre Mykorrhiza - auch die *Geosiphon*-Symbiose als Anpassung an Phosphatmangel im Boden zu werten ist (MOLLENHAUER, 1970; MOLLENHAUER, 1988; SCHÜßLER, 1995; SCHÜßLER & KLUGE, 2001), war bisher über die Aufnahme und Metabolisierung von Phosphat durch dieses symbiotische System überhaupt noch nichts bekannt. Es lag nahe zu versuchen, zunächst einmal Klarheit über die Konzentrationsabhängigkeit der Phosphataufnahme zu schaffen und dabei u. a. Erkenntnisse über die Affinität des für die Phosphataufnahme verantwortlichen Translokatorsystems zu seinem Substrat zu gewinnen. Nach einigen orientierenden, in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigten Experimenten wurde bald klar, dass diese Fragestellung mit unserer Tracertechnik nicht erfolgreich angegangen werden konnte, und zwar aus folgenden Gründen:

1. Es stand nicht genug Versuchsmaterial zur Verfügung, um bei möglichst vielen Phosphatkonzentrationen mit mehreren parallelen Proben statistisch auswertbare Messungen durchführen zu können.

2. Es konnte bei Inkubation von Blasen von *Geosiphon pyriformis* und Zellen von *Nostoc punctiforme* mit ^{32}P -haltigem Medium nicht eindeutig geklärt werden, ob die radioaktive Markierung des nach der Inkubation aus den Blasen extrahierbaren Tracers tatsächlich in die Blasen bzw. Zellen selbst aufgenommen wurde oder nur äußerlich an der Wand anhaftete bzw. sich in irgendwelchen Kompartimenten des „apparent free space“ befand.
3. Die Erfassung von Aufnahmezeiten erfordert eindeutige Bezugsgrößen. Dieses Problem ist für *Geosiphon pyriformis* nach wie vor ungelöst. Die einzige hier derzeit verfügbare Bezugsgröße, nämlich Anzahl der Blasen pro Versuchsansatz, erwies sich als zu ungenau für die Erfassung von Aufnahmezeiten.

Auch wenn die Messung von konzentrationsabhängigen Aufnahmezeiten und damit die Bestimmung der Affinität des angenommenen P_i -Translokators zu seinem Substrat aus den oben genannten Gründen scheiterte, so bestand dennoch die Möglichkeit, mit Tracertechnik zu untersuchen, ob Phosphat in die Blasen aufgenommen und dort metabolisiert wird. Trifft Letzteres zu, so war nach der Inkubation mit $^{32}\text{P}_i$ das Auftreten radioaktiv markierter Stoffwechselprodukte zu erwarten, womit sich die Möglichkeit ergab, Markierungsmuster, d. h. den relativen Anteil einer bestimmten markierten Verbindung an der gesamten löslichen Radioaktivität zu vergleichen. Besonders aufschlussreich erschien hier der Vergleich des Verhaltens intakter *Geosiphon*-Blasen mit dem freilebender *Nostoc*-Zellen und dies bei Inkubation im Licht bzw. in der Dunkelheit. Die Ergebnisse derartiger Experimente sind im Folgenden dargestellt.

4.4.1 Abhängigkeit der Markierungsmuster von der Inkubationsdauer mit $^{32}\text{P}_i$

4.4.1.1 Markierung des anorganischen Phosphats relativ zu der organischer Verbindungen

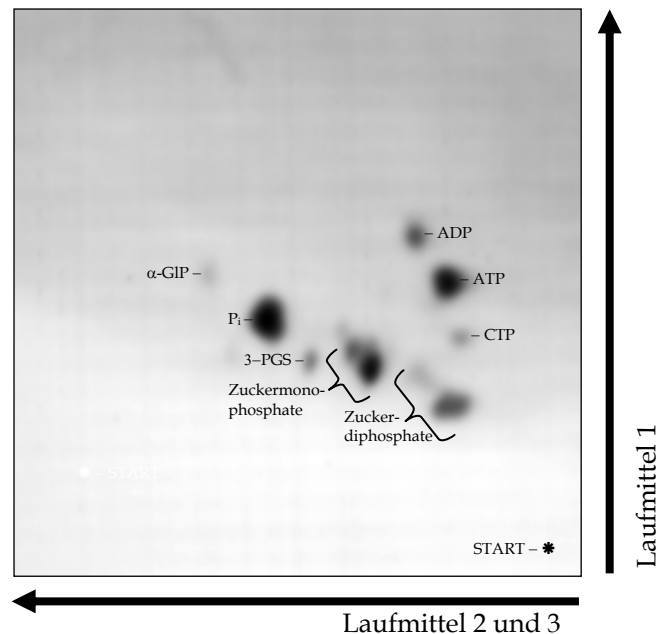


Abb. 26: Autoradiogramm eines zweidimensionalen Dünnschichtchromatogrammes eines Extraktes von *Geosiphon*-Blasen, die 1min im Licht mit $^{32}\text{P}_i$ gefüttert wurden.
Phosphatkonzentration: 5.4 nM (d.h. trägerfrei)

wichtige Verbindungen: ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, CTP: Cytosintriphosphat,
α-GIP: α-Glycerophosphat, P_i : anorganisches Phosphat, 3-PGS: 3-Phosphoglycerinsäure
Pfeile geben die Laufrichtungen (1. bzw. 2. und 3.) der Chromatographie an

Abbildung 26 zeigt, daß bereits eine Minute nach Beginn einer Inkubation von *Geosiphon*-Blasen mit praktisch trägerfreiem $^{32}\text{P}_i$ neben radioaktivem anorganischem Phosphat auch eine Vielzahl von markierten organischen Verbindungen aus den Blasen extrahiert werden konnte, vor allem Phosphatester von Zuckern und Nukleotidphosphate. In dem in Abb. 26 gezeigten Experiment war die Gesamtkonzentration an P_i in der Inkubationslösung mit 5.4 nM außerordentlich niedrig. Das Auftreten eines so komplexen Markierungsmusters nach einer Inkubationszeit von lediglich einer Minute beweist zumindest, daß *Geosiphon* über ein hochaffines Aufnahmesystem für Phosphat verfügen muß.

Obwohl ein beträchtlicher Teil der löslichen Radioaktivität in organischen Verbindungen anzutreffen war, zeigte sich das anorganische Phosphat meist als die am stärksten markierte Fraktion, und zwar unabhängig von der Inkubationsdauer (Abb. 27). Bei den intakten Blasen von *Geosiphon pyriformis* war der relative Anteil der Markierung des anorganischen Phosphats etwas geringer als bei freien *Nostoc*-Zellen. Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Systemen bestand darin, daß bei den intakten Blasen der relative Anteil des P_i an der löslichen Radioaktivität im Licht generell höher lag als im Dunkeln, während bei den freien *Nostoc*-Zellen das Gegenteil der Fall war (vergl. ebenfalls Abb. 27)

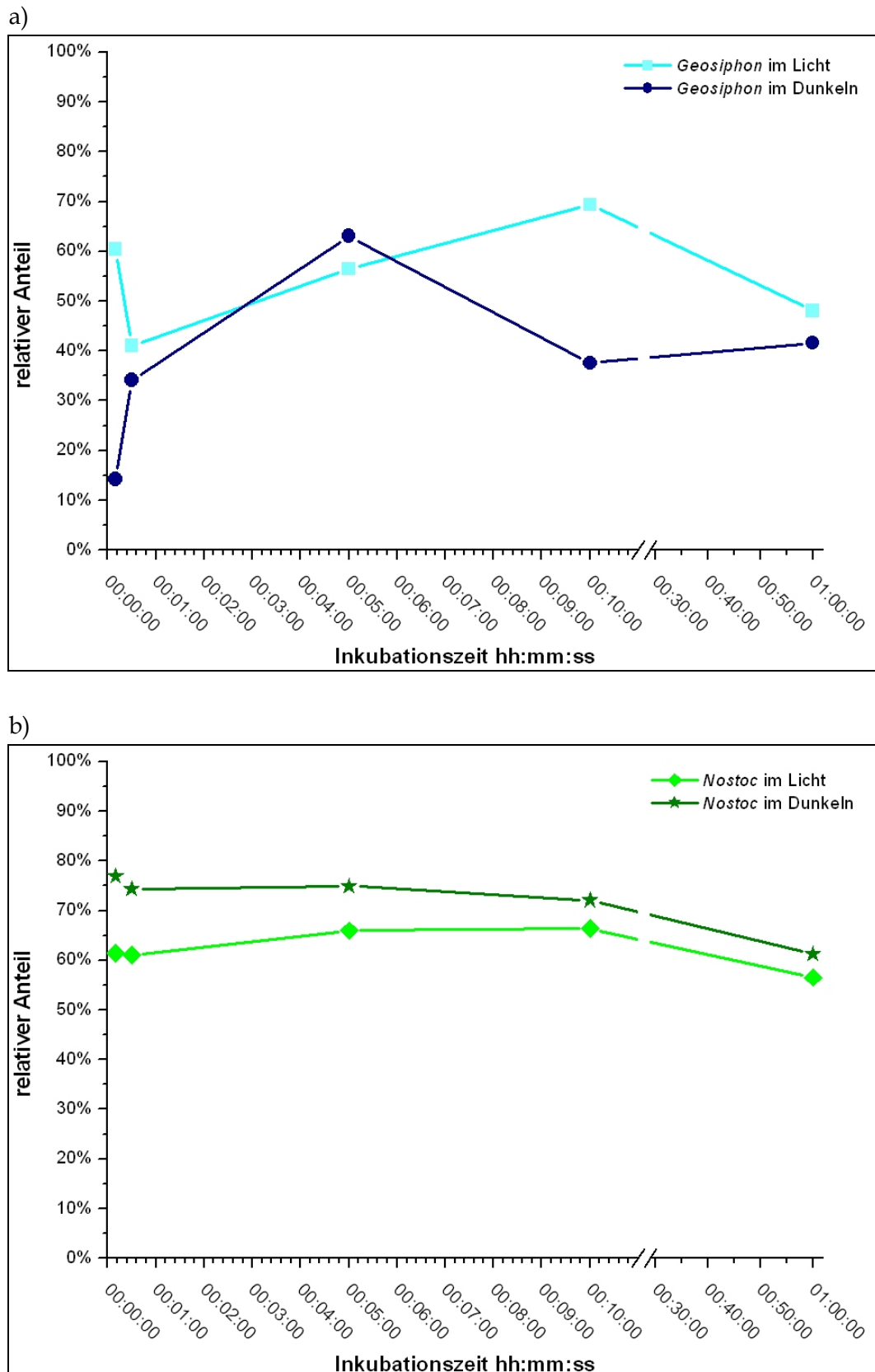


Abb. 27: Relativer Anteil der Markierung des anorganischen Phosphats (P_i) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, in [a)] *Geosiphon*-Blasen, bzw. [b)] *Nostoc*-Zellen; Einzelexperimente, auf der x-Achse ist die Dauer des $^{32}P_i$ -Angebots aufgetragen

4.4.1.2 Markierungsverhalten bestimmter Metabolite

Um das Markierungsverhalten von Metaboliten besser verfolgen zu können, schien es sinnvoll, bei der Berechnung des relativen Anteils der Markierung einer bestimmten Verbindung an der löslichen Radioaktivität die vorherrschende Markierung von P_i nicht mit zu berücksichtigen. Im Folgenden wird daher der relative Anteil bestimmter Metabolite an der nicht als P_i vorliegenden löslichen Radioaktivität dargestellt. Dazu wurde die Radioaktivität aller löslichen organischen Verbindungen gleich 100 % gesetzt.

Zu den Metaboliten, die in unseren Experimenten durchgehend markiert waren und die sich daher für Vergleiche eigneten (vergl. Abb. 37 oder auch Abb. 31), gehören ATP, 3-Phosphoglycerinsäure, sowie Zuckermono- und -diphosphate. Die Abhängigkeit der Markierung dieser Metabolite von der Dauer der Inkubation mit $^{32}P_i$ ist in den Abbildungen 29 bis 31 dargestellt.

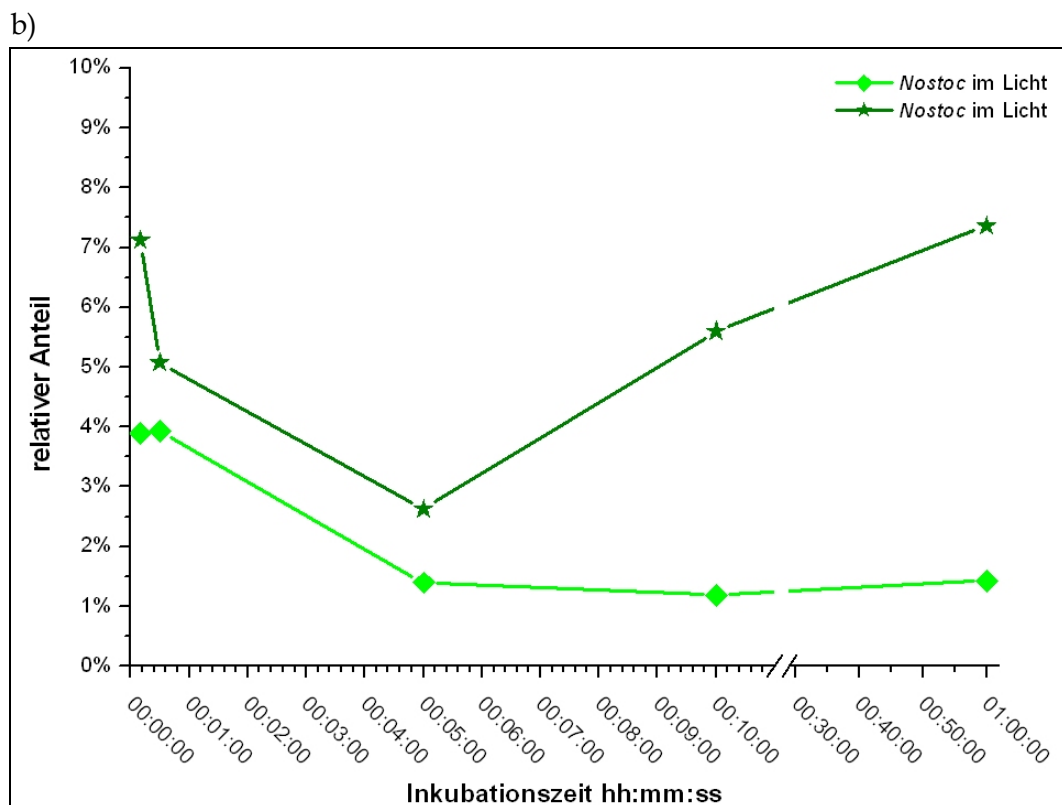
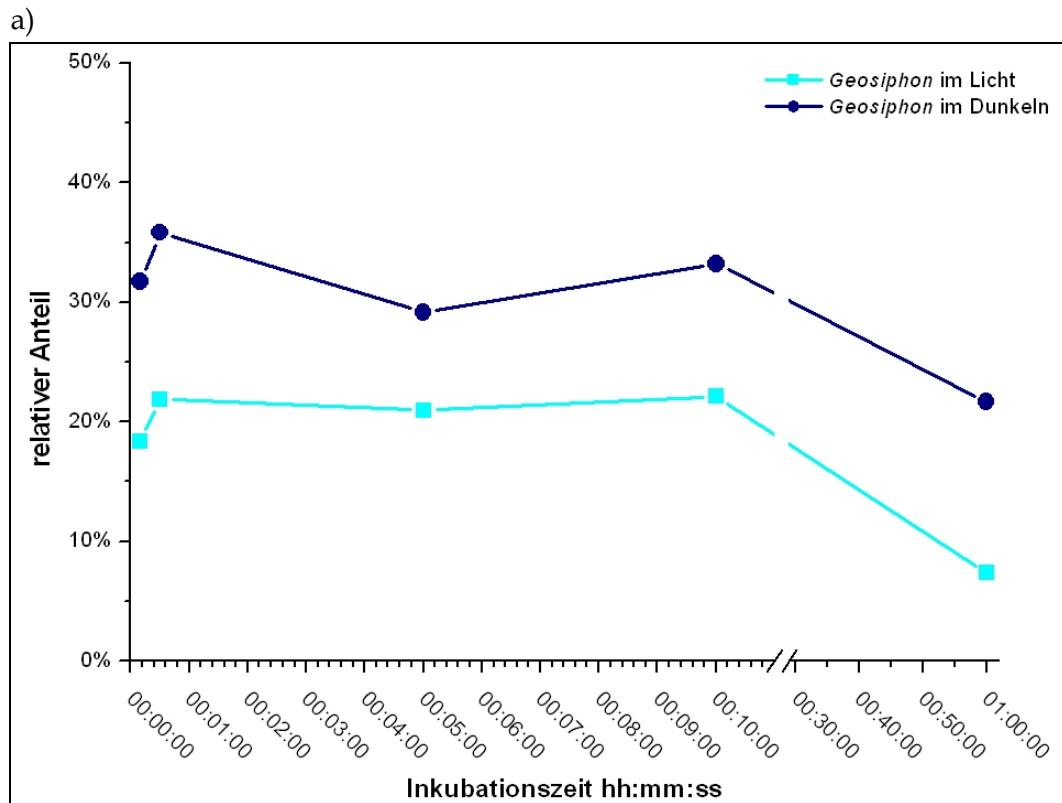


Abb. 28: Relativer Anteil der Markierung des ATP an den markierten organischen Phosphatverbindungen in Abhängigkeit von der ^{32}P -Inkubationsdauer

[a)] *Geosiphon*-Blasen, [b)] *Nostoc*-Zellen

Einzelexperimente, auf der x-Achse ist die Dauer des $^{32}\text{P}_i$ -Angebots aufgetragen

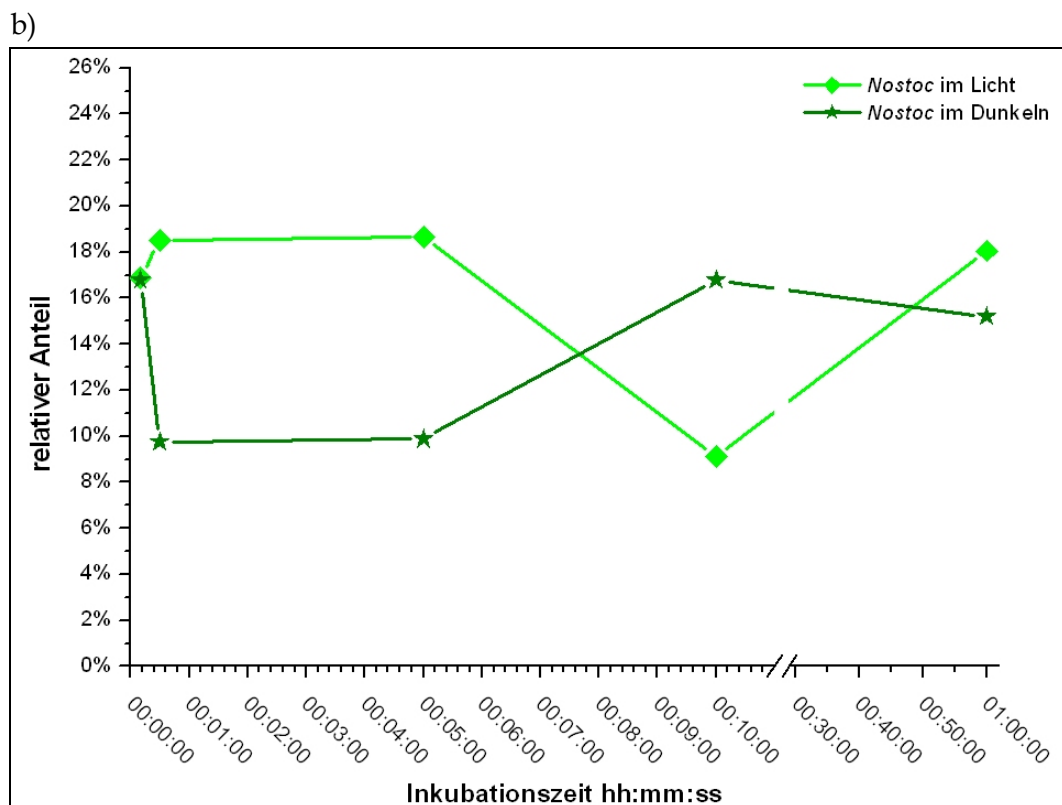
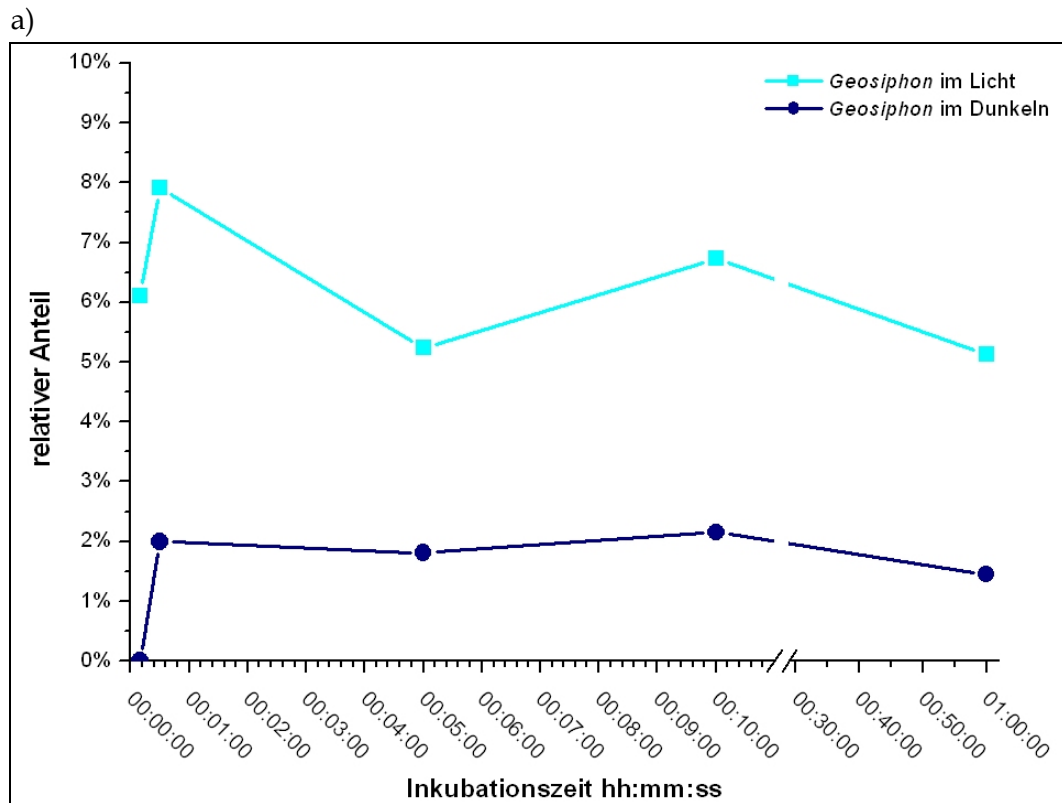


Abb. 29: Relativer Anteil der Markierung der 3-Phosphoglycerinsäure an den markierten organischen Phosphatverbindungen in Abhängigkeit von der ^{32}P -Inkubationsdauer
[a)] *Geosiphon*-Blasen, [b)] *Nostoc*-Zellen

Einzelexperimente, auf der x-Achse ist die Dauer des $^{32}\text{P}_i$ -Angebots aufgetragen

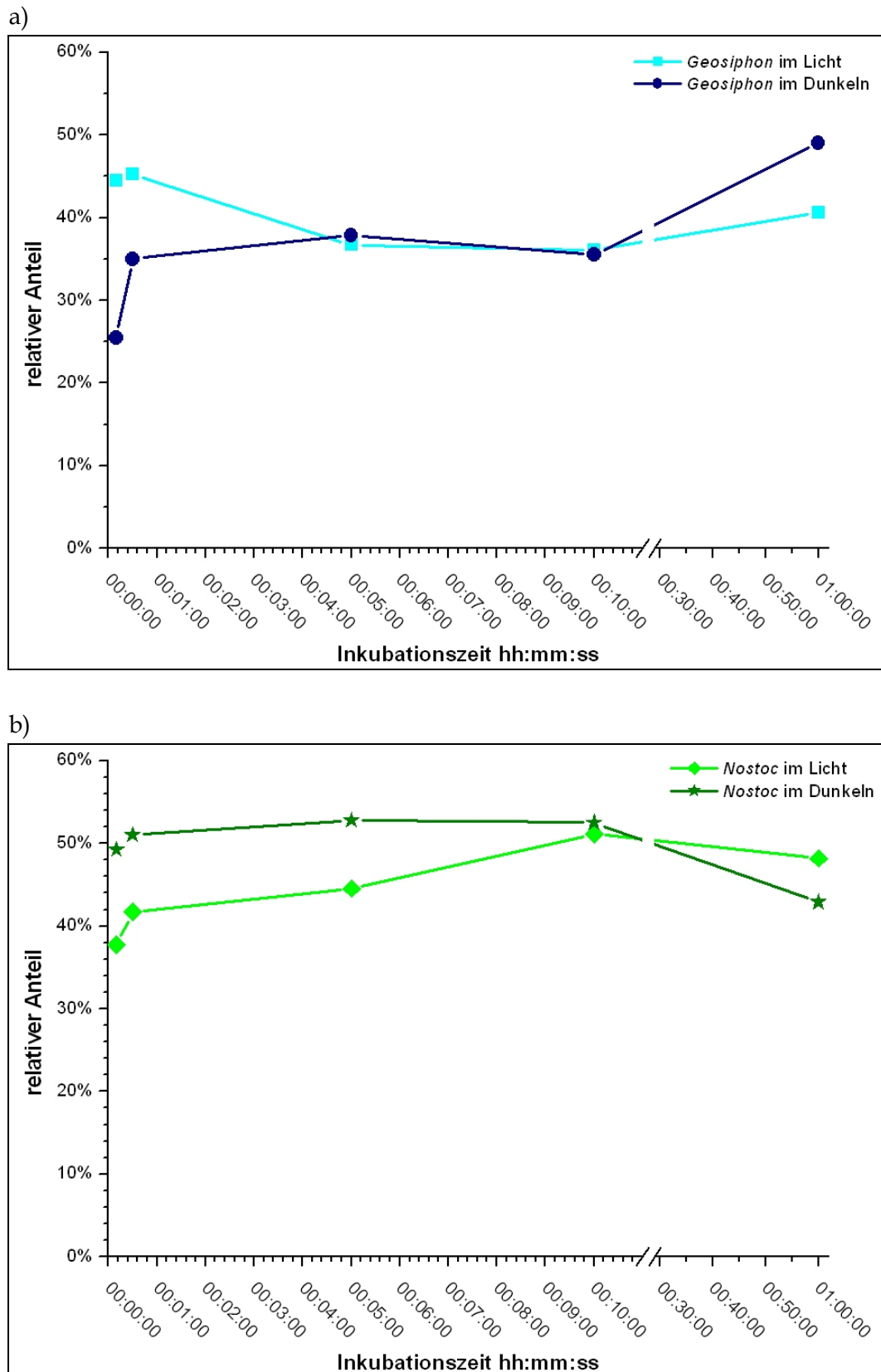


Abb. 30: Relativer Anteil der Markierung der Zuckermono- und -diphosphate an den markierten organischen Phosphatverbindungen in Abhängigkeit von der ^{32}P -Inkubationsdauer

[a)] Geosiphon-Blasen, [b)] Nostoc-Zellen

Einzelexperimente, auf der x-Achse ist die Dauer des ^{32}P -Angebots aufgetragen

ATP zeigte in allen Ansätzen bereits 10 Sekunden nach Applikation des Tracers deutliche Markierung, deren relativer Anteil an der Gesamtmarkierung aller Metabolite sich auch bei längerer Applikation des Tracers nicht mehr wesentlich änderte (Abb. 29). Bei den intakten Blasen von *Geosiphon pyriformis* war ATP relativ stärker markiert als in den freien *Nostoc*-Zellen. In beiden Systemen wurde ATP bei Applikation des Tracers im Dunkeln stärker markiert als im Licht.

Bei der Markierung von 3-Phosphoglycerinsäure (3-PGS, vergl. Abb. 30) zeigten sich hingegen deutliche Unterschiede: Bei den freien *Nostoc*-Zellen war der relative Anteil der 3-PGS-Markierung deutlich höher als bei den Blasen von *Geosiphon pyriformis*. Bei diesen wurde, im Gegensatz zu den freien *Nostoc*-Zellen, 3-PGS im Licht wesentlich stärker markiert als im Dunkeln.

Da sich auf den Chromatogrammen die einzelnen Zuckerphosphate oft nicht vollständig trennen ließen, wurden sie gemeinsam eluiert und ausgewertet. Auch die Zuckerphosphate (vergl. Abb 31) wurden sofort nach Applikation des Tracers stark markiert und änderten ihren Anteil am Markierungsmuster bei Verlängerung der Inkubationsdauer nicht mehr wesentlich. Dies gilt sowohl für die *Geosiphon*-Blasen als auch für die freien *Nostoc*-Zellen. Weder bei den Blasen von *Geosiphon pyriformis* noch bei den *Nostoc*-Zellen zeigten sich signifikante Unterschiede des Markierungsverhaltens der Zuckerphosphate bei Inkubation im Licht oder Dunkeln.

4.4.1.3 Pulse-Chase-Experimente

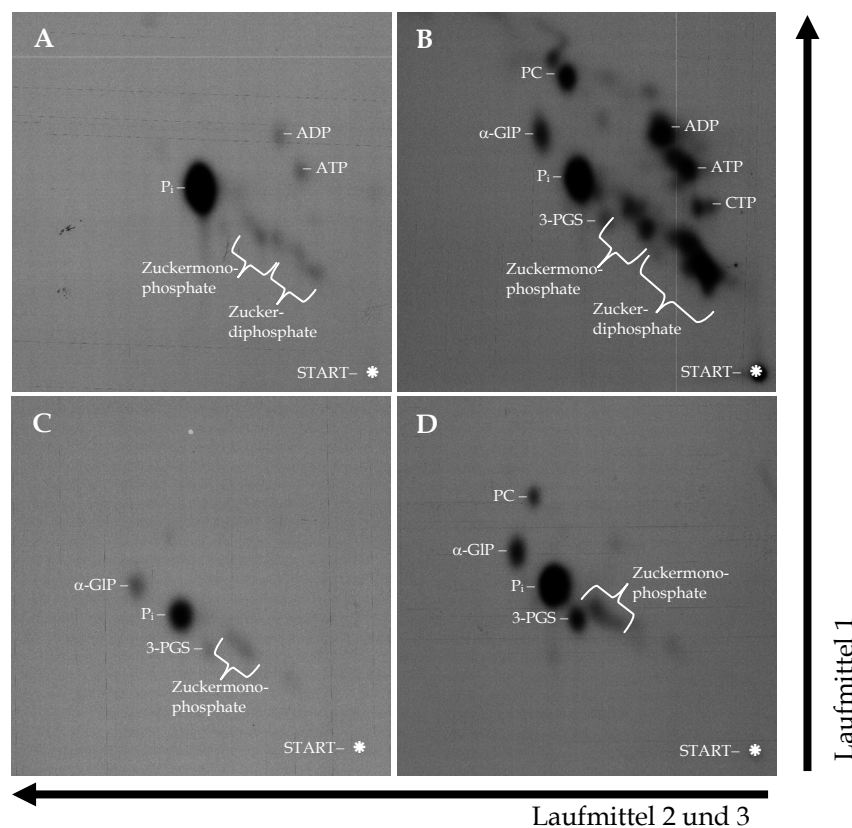


Abb. 31: Autoradiogramme von 2D-Dünnschichtchromatogrammen, die Beispiele von unterschiedlichen Markierungsmustern aus Pulse-Chase-Experimenten zeigen (Inkubationspuls = 1 min im Dunkeln)

A - Blasen von *Geosiphon pyriformis*, am Ende des Pulses, B - Blasen von *Geosiphon pyriformis*, Chase = 60 min im Licht

C - Zellen von *Nostoc punctiforme*, am Ende des Pulses, D - Zellen von *Nostoc punctiforme*, Chase = 60 min im Licht

wichtige Verbindungen: ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, CTP: Cytosintriphosphat, α-GIP: α-Glycerophosphat, P_i: anorganisches Phosphat, PC: Phosphatidylcholin, 3-PGS: 3-Phosphoglycerinsäure
Pfeile geben jeweils die Laufrichtungen (1. bzw. 2. u. 3.) der Chromatographie an

Bei Pulse-Chase-Experimenten wird der Tracer nur für eine kurze Zeitdauer („pulse“, hier 1 min) in einer Konzentration von 10 μM appliziert. Auf den Pulse folgt eine unterschiedlich lange Nachinkubationszeit („chase“), in welcher der Tracer durch „kaltes“, nichtradioaktives Substrat ersetzt wird. In dieser Zeit werden Proben genommen und auf die Markierungsmuster hin untersucht. Pulse-Chase Experimente liefern Informationen über die Reihenfolge und den zeitlichen Verlauf, in welchen einmal aufgenommener Tracer, hier also P_i, im Stoffwechsel an bestimmte Metabolite weitergegeben wird.

Bereits der visuelle Vergleich von Markierungsmustern, die sich bei Pulse-Chase-Experimenten mit *Geosiphon*-Blasen einerseits und freien *Nostoc*-Zellen andererseits auf den Autoradiogrammen der zweidimensionalen DC manifestierten, zeigen beträchtliche Unterschiede im Verhalten der beiden Systeme (vergl. Abb. 31). Im Falle der Blasen wird mit dem während des Pulses aufgenommenen P_i im Verlauf des Chase eine Vielzahl von organischen Verbindungen markiert, während die *Nostoc*-Zellen das Phosphat an wesentlich weniger Verbindungen weitergeben. Dies wird durch die quantitative Auswertung der Chromatogramme klar bestätigt:

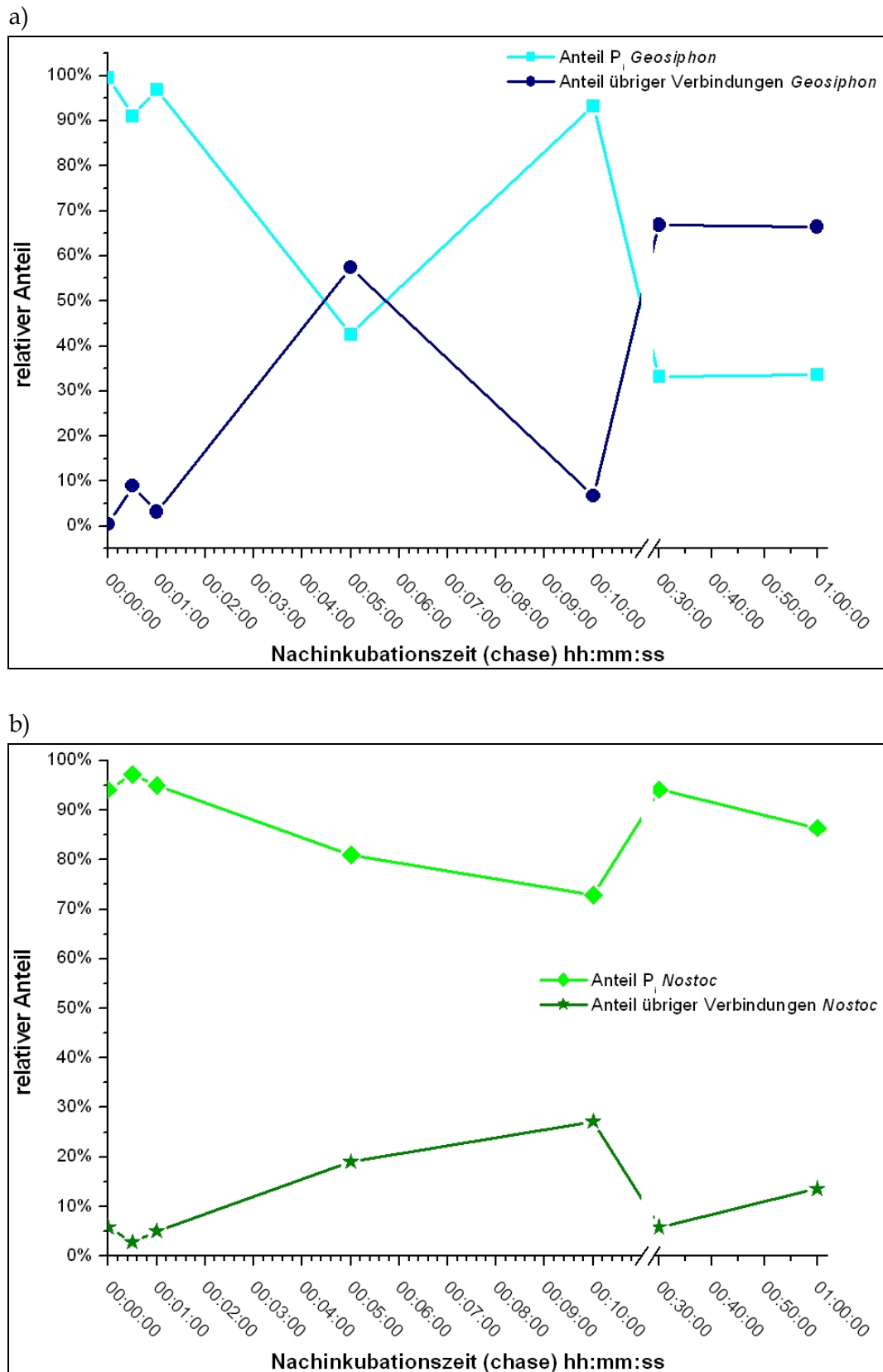


Abb. 32: Relative Anteile von Markierung in P_i im Vergleich zu organischen Verbindungen bei *Geosiphon* [a]) und *Nostoc* [b]) in Abhängigkeit von der Dauer des Chase.

Einzelexperimente, ^{32}P -Puls ($\Sigma\text{-}[P_i] = 10\mu\text{M}$) 60 s im Dunkeln, Nachinkubationszeit (chase) im Licht

Abbildung 32 zeigt, daß *Geosiphon*-Blasen im Verlauf eines einstündigen Chase ca. 70 % der zunächst im P_i vorhandener löslichen Radioaktivität in organische Verbindungen überführten, im Gegensatz zu weniger als 20 % im Falle der freien *Nostoc*-Zellen.

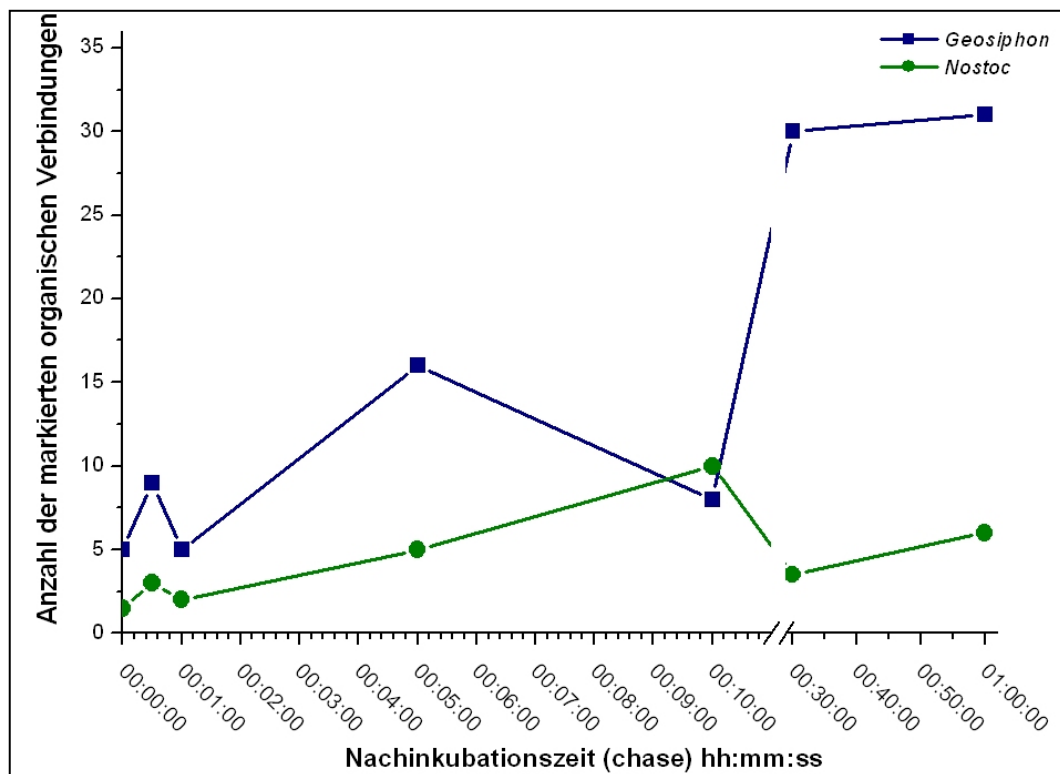


Abb. 33: Vergleich der Markierungsmuster (organische Phosphorverbindungen) bei *Nostoc* und *Geosiphon* im Verlauf des Chase

^{32}P -Puls ($\Sigma\text{-}[P_i] = 10\mu\text{M}$) 60 s im Dunkeln, Nachinkubationszeit (chase) im Licht

Aus Abbildung 33 geht hervor, dass im Verlauf des einstündigen Chase bei den *Geosiphon*-Blasen ca. 30, bei den freien *Nostoc*-Zellen aber nur 5–10 Metabolite markiert wurden.

Der Vergleich des Verhaltens einzelner Verbindungen in den Pulse-Chase-Experimenten erwies sich als unsicher, da manche Verbindungen nicht zu allen Zeitpunkten mit der erforderlichen Deutlichkeit markiert waren. Immerhin zeigten sich zwischen den *Geosiphon*-Blasen und den freien *Nostoc*-Zellen folgende Unterschiede:

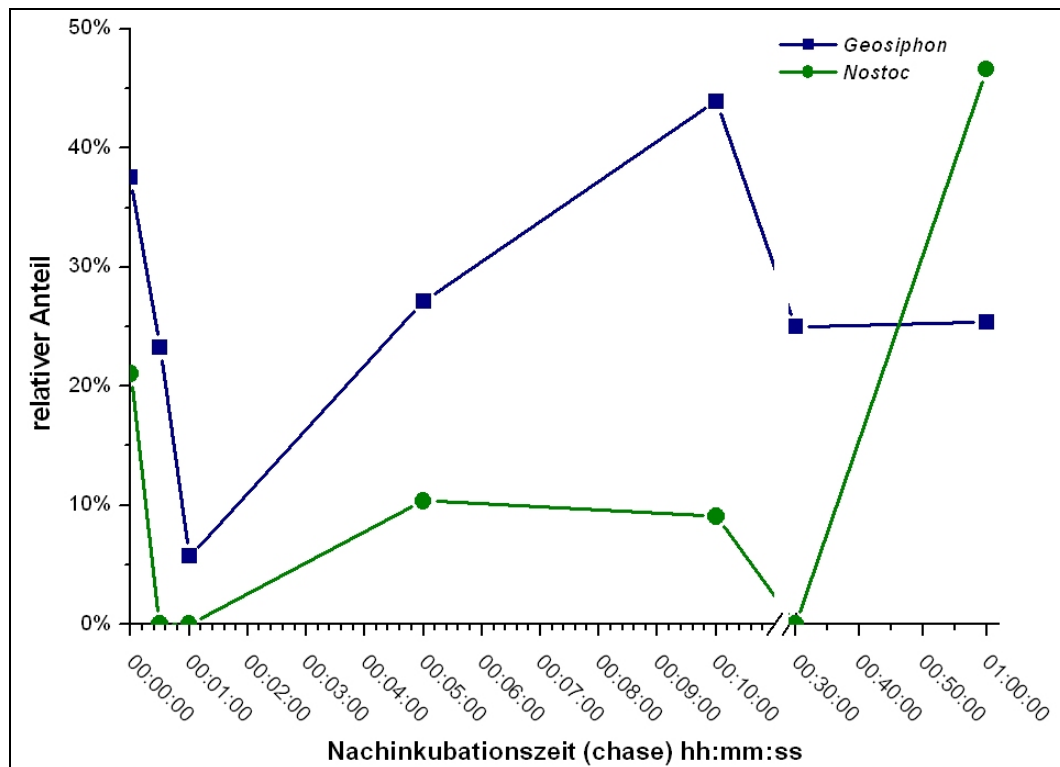


Abb. 34: Relativer Anteil der Markierung in Zuckermmono- und -diphosphaten an den markierten organischen Phosphatverbindungen im Vergleich *Geosiphon/Nostoc*

Einzelexperiment, ^{32}P -Puls ($\Sigma\text{-[P}_i\text{]} = 10\mu\text{M}$) 60 s im Dunkeln, Nachinkubationszeit (chase) im Licht

Zuckerphosphate (vergl. Abb. 34) wurden im Falle der Blasen im Verlauf des Chase sehr schnell deutlich markiert und behielten den Markierungsanteil weitgehend bei, sieht man einem möglichen Ausreißer nach einer Chase-Dauer von einer Minute ab. Im Falle der *Nostoc*-Zellen erwies sich der relative Anteil der Zuckerphosphat-Markierung am Anfang des Chase deutlich niedriger als bei den Blasen von *Geosiphon pyriformis*, übertraf deren Markierung am Ende des Chase (60 min) allerdings. 3-PGS und α -Glycerophosphat wurden im Verlauf des Chase praktisch nur bei den freien *Nostoc*-Zellen, kaum aber bei den *Geosiphon*-Blasen markiert (vergl. Abb. 35).

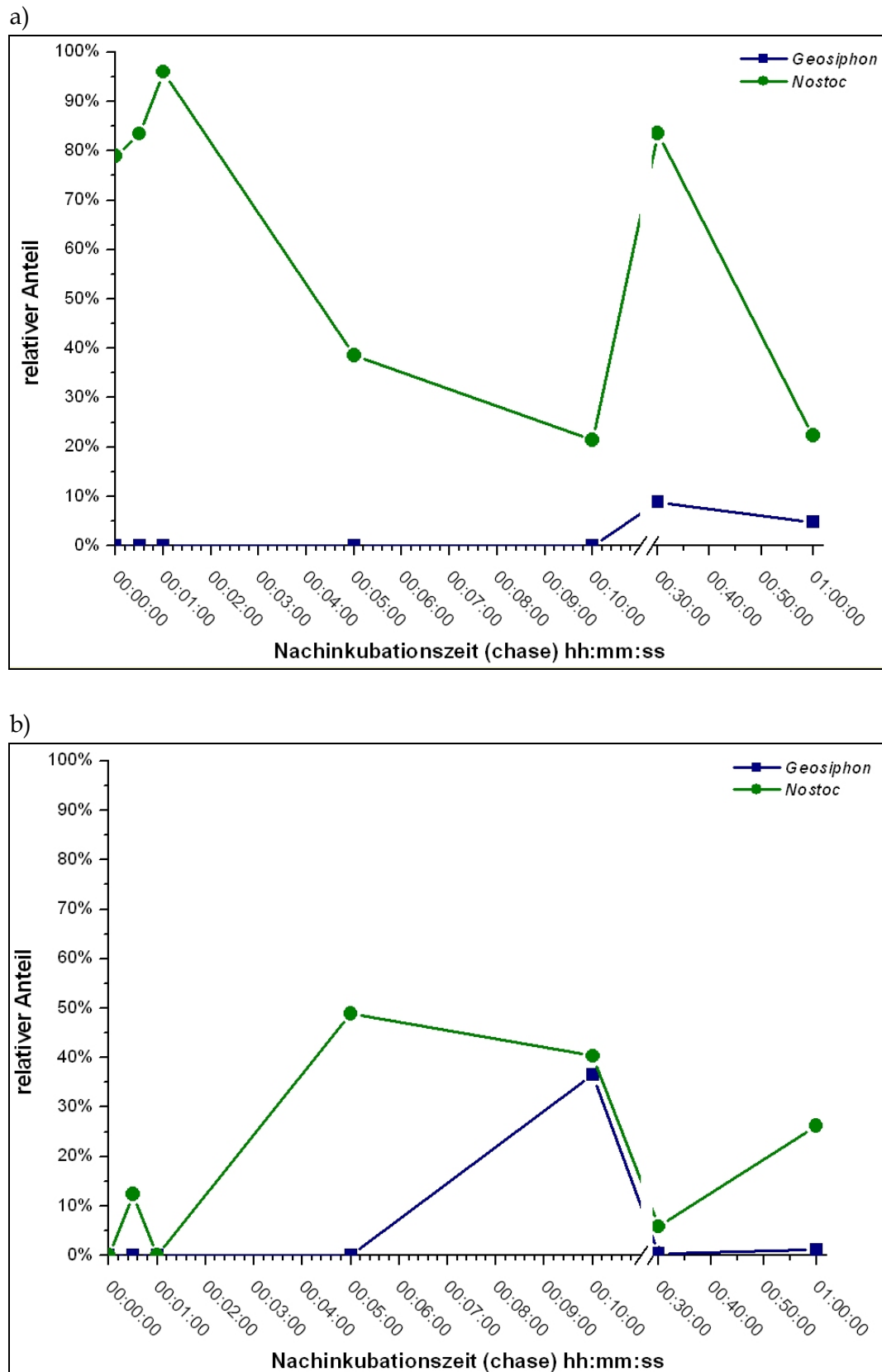


Abb. 35: Relative Anteile der Markierung von α -Glycerophosphat [a)] und 3-Phosphoglycerinsäure [b)] an den markierten organischen Phosphatverbindungen, bei *Geosiphon* bzw. *Nostoc*

Einzelexperimente, ^{32}P -Puls ($\Sigma\text{-[P]} = 10\mu\text{M}$) 60 s im Dunkeln, Nachinkubationszeit (chase) im Licht

5 Diskussion

5.1 Molekularbiologische Untersuchungen

5.1.1 Aufbau und Screening von genomischen und cDNA-Genbanken

Geosiphon pyriformis stellt einen ursprünglichen Vertreter der *Glomeromycota* dar (SCHÜßLER ET AL. 2001). Wie bei allen Vertretern dieses Pilz-Phylums findet man in seinem Lebenszyklus keine sexuellen Vorgänge (SANDERS, 1999). Die Vermehrung und Verbreitung findet ausschließlich über Sporen statt. Die *Glomeromycota* umfassen im Wesentlichen die arbuskulären Mykorrhizapilze (AM-Pilze), die mit ca. 80 % aller Landpflanzen symbiotische Beziehungen an der Wurzel eingehen (SMITH & READ, 1997). Für den Pilz *Geosiphon pyriformis* ist bislang nur eine Endosymbiose mit Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* bekannt. Der Nachweis dafür, dass *Geosiphon pyriformis* auch dazu in der Lage ist, eine echte Mykorrhiza mit Pflanzen auszubilden, fehlt bislang. Es gilt aber trotzdem, wie für die übrigen AM-Pilze auch, dass er obligat symbiotisch ist (MOLLENHAUER, PERS. MITTEILUNG), d. h. ohne die Ausbildung einer Symbiose ist der Pilz nicht in der Lage, seinen Lebenszyklus zu vollenden und sich durch Bildung weiterer Sporen zu vermehren und zu verbreiten. Aus den genannten Gründen ist es bereits bei anderen AM-Pilzen schwierig, DNA für molekularbiologische Experimente in ausreichendem Maße zu gewinnen. Da die Kultivierung von *Geosiphon pyriformis* zwar möglich, jedoch nicht in sicherer Weise und bis zur Gewinnung größerer Biomasse gelungen ist, stehen auch Sporen, die eine sichere Quelle pilzlicher DNA darstellen (SCHWARZOTT & SCHÜßLER, 2001), nur begrenzt zur Verfügung.

Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit, ausgehend von Sporen- und Blasenmaterial von *Geosiphon pyriformis*, eine genomische bzw. cDNA-Genbank aufgebaut und damit eine Grundlage zur Isolierung spezifischer Gene, wie des *high-affinity* Phosphattransporter-Gens geschaffen werden. Des Weiteren sollten die Genbanken auch in Zukunft die Grundlage für die Durchführung molekularbiologischer Experimente darstellen.

5.1.1.1 Aufbau und Screening einer genomischen Genbank

Die vorliegenden Ergebnisse zum Aufbau einer genomischen DNA-Bank, basierend auf dem Einbau von bis zu 10 kb großen DNA-Fragmenten von *Geosiphon pyriformis* in einen Phage- λ -Vektor, zeigten, dass es nicht nur möglich ist, DNA aus Einzelsporen von *Geosiphon pyriformis* zu isolieren. Vielmehr konnten aus einer großen Sporenanzahl durch Optimierung der Methode von ZÉZÉ ET AL. (1994) auch größere Mengen chromosomaler DNA sauber isoliert und für den Aufbau einer genomischen DNA-Bank verwendet werden (vgl. 4.4.1). Der bestimmte Titer der genomischen DNA-Bank liegt im oberen Drittel des für diese Genbanken üblichen Bereichs ([HTTP://WWW.STRATAGENE.COM](http://www.stratagene.com)). Es besteht nun die Möglichkeit, den Großteil des Genoms von *Geosiphon pyriformis* innerhalb der λ -Phagenpartikel unbegrenzt zu lagern, zu vermehren und für molekularbiologische Experimente zur Verfügung zu haben (KNIPPERS, 1995).

Bereits in der grundlegenden Arbeit von SHORT ET AL. (1988) zum Aufbau genomischer DNA-Genbanken dieses Typs wie auch in Standard-Laborhandbüchern (SAMBROOK ET AL., 1989) wurde erkannt und darauf hingewiesen, dass Teile eines Genoms beim Aufbau einer

Genbank verloren gehen. Dabei handelt es sich um Anteile, die nach dem zugrunde liegenden Verdau der isolierten DNA für den Einbau in den Vektor (hier Phage λ , entsprechendes gilt aber auch für Vektoren größerer Kapazität) zu klein oder zu groß sind. Zu kleine Fragmente führen dazu, dass der rekombinante Phage sich nicht mehr reproduzieren kann, zu große Fragmente können nicht in die Phagenköpfe verpackt werden (SAMBROOK ET AL., 1989). Die Wahrscheinlichkeit, ein bestimmtes Fragment aus einer Genbank durch Screening isolieren zu können, wird nicht zuletzt auch davon beeinflusst, in welcher Kopienanzahl das Gen im Genom eines Organismus vorhanden ist (SAMBROOK ET AL., 1989).

Aus diesen Gründen war es trotz intensiven Screenings nicht möglich, bei *Geosiphon pyriformis* mit einer heterologen Sonde (Teilfragment des *high-affinity* Phosphattransporters, HARRISON & VAN BUUREN, 1995) aus der aufgebauten genomischen DNA-Genbank einen Vollängenklon des homologen Gens zu isolieren. Das Screening mit einer homologen Sonde, hier einem Teilfragment des 18 S-rRNA-Gens, das in hoher Kopienanzahl auf dem Genom vorliegt (SCHÜßLER ET AL., 2001), führte jedoch zum gewünschten Erfolg, so dass methodische Fehler während des Genbankscreenings ausgeschlossen werden konnten.

Durch direkte PCR und *nested* PCR aus der Genbank konnte ein Teilfragment eines Phosphattransportergens auf DNA-Ebene isoliert und charakterisiert werden. Ein homologes Fragment konnte bei anderen AM-Pilzen (*Glomus versiforme* und *Glomus intraradices*) bislang ausschließlich auf RNA-Ebene aus cDNA-Genbanken nachgewiesen werden (HARRISON & VAN BUUREN, 1995, MALDONADO-MENDOZA ET AL., 2001). Diese lagen als „*single-copy*“-Gene auf dem Genom vor. Jedoch war es auch hier trotz intensiven Screenings nicht möglich, unter Einsatz dieses Fragments als Sonde, einen Phagenklon zu isolieren und zu vermehren, der dieses Fragment als DNA-Insertion trägt. Die Anreicherung von einzelnen Phagenklonen (vgl. 4.1.3, Abb. 15) mit größeren *Geosiphon*-DNA-Insertionen durch das Screening war nach der Sequenzierung als unspezifische Bindungen der Sonden zu erkennen. Es ist lange bekannt, dass unspezifische Bindungen der Sonde bei Genbankscreenings regelmäßig auftreten, und auch üblicherweise erst nach Sequenzierung der Klone erkannt werden können (MÜLHARDT, 1999). Dies bedeutet aber nicht zwingend, dass das Gen in der Genbank nicht vorhanden ist. Bei eingesetzten 1.900 Sporen zum Aufbau der Genbank und etwa 1.000 Zellkernen pro Spore (HOSNY ET AL., 1998) würde im statistischen Mittel maximal jeder fünftausendste Phagenklon eine Kopie des entsprechenden „*single-copy*“-Gens enthalten. Aufgrund der oben genannten Möglichkeiten der Verluste ist sogar noch von einem geringeren Anteil auszugehen, so dass in den 500.000 pfu (plaque forming unit), die in einem Screening eingesetzt wurden, evtl. kein oder nur einzelne entsprechende Phagenklone vorliegen würden. In Abhängigkeit von der Komplexität einer Genbank (Verteilung der vorhandenen Klone auf die Phagen) geht man davon aus, in weniger als ca. 100 μ l Phagensuspension den gesuchten Klon finden zu können (MÜLHARDT, 1999). Da in der PCR, mit der das als Sonde verwendete Fragment amplifiziert wurde, die etwa 1.000 fache Menge wie bei einem Genbankscreening als Template verwendet und eine zweite Amplifikation mit *nested*-PCR durchgeführt wurde, ist von einer äußerst geringen Anteil von Phagenklonen auszugehen, die tatsächlich ein Fragment des *high-affinity* Phosphattransporter-Gens tragen.

Diese hier erstellte genomische DNA-Bank eröffnet nun - unabhängig vom jeweiligen Zustand der *Geosiphon*-Kulturen - für die Zukunft weitere Untersuchungen des Phosphattransporters auf molekularer Ebene. Dies gilt auch für andere Fragestellungen bzw. die Untersuchung weiterer Gene.

5.1.1.2 Aufbau einer cDNA-Genbank

Eine cDNA-Genbank wird dazu verwendet, um die gesamten, zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion exprimierten Gene in eine stabile Dauerform zu überführen. RNA-Moleküle sind labil und müssen für weitere molekularbiologische Experimente in stabile, doppelsträngige cDNA (copy-DNA) revers transkribiert werden. Wird diese cDNA in einen selbstreplizierenden Vektor (z. B. λ -Phagen) verpackt, können einzelne zum entsprechenden Zeitpunkt exprimierte Gene isoliert und charakterisiert werden. Dies hat gegenüber einer genomischen DNA-Bank den Vorteil, dass zum einen nicht-exprimierte Gene ausgeschlossen werden und zum anderen die exprimierten Gene bereits posttranskriptional prozessiert vorliegen, d. h. es können Fragmente funktioneller Genabschnitte ohne evtl. im Genom vorliegende Introns isoliert werden (KNIPPERS, 1995).

Für den Aufbau einer cDNA-Genbank mit dem Stratagene UniZAP SR-Vektor (Stratagene, Heidelberg) setzte HEUTE (1999) ca. 200 μ g Gesamt-RNA ein. Aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Blasenmaterials von *Geosiphon pyriformis* konnten für den Aufbau einer cDNA-Genbank nur ca. 25 μ g Gesamt-RNA (Abschätzung der Menge nach HEUTE, 1999) isoliert werden. Die daraus isolierte mRNA (ca. 1-5 %, SAMBROOK ET AL. 1989) sollte prinzipiell für den Aufbau einer cDNA-Genbank ausreichend sein, da für einen Ligationsansatz in den Phagenvektor 100 ng cDNA benötigt werden. Die erste Möglichkeit, die abgelaufenen Reaktionen zu kontrollieren, stellte die Gelelektrophorese der radioaktiv markierten cDNA-Erst- und -Zweitstränge dar (vgl. 4.1.2, Abb. 14). Dabei zeigte sich, dass keine radioaktive Markierung bei den aus isolierter mRNA von *Geosiphon pyriformis* revers transkribierten Erst- und Zweitsträngen nachgewiesen werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass die Verluste durch die Isolation von poly-A-mRNA aus der Gesamt-RNA so groß waren, dass nicht genügend Template für die reverse Transkription der mRNA zur Verfügung stand.

Trotz wiederholter Versuche gelang es in der vorliegenden Arbeit nicht, von *Geosiphon pyriformis* eine genügende Menge Blasenmaterial zu kultivieren, die ausgereicht hätte, eine cDNA-Bank aufzubauen.

5.1.2 Molekularbiologische Charakterisierung pilzlicher Gene

Im Rahmen der Arbeiten zum Aufbau und Screening einer genomischen DNA-Genbank wurde diese auch als DNA-Template in verschiedenen PCR-Reaktionen eingesetzt. Dies hatte, wie bereits oben erläutert (vgl. 5.1.1), den Vorteil, dass man erheblich mehr Phagenpartikel in einer Reaktion einsetzen und durch die exponentielle Vermehrung auch nur selten in der Genbank vorhandene DNA-Fragmente vervielfältigen kann. Daneben stellt eine PCR mit Genbankmaterial als Matrize auch eine erhebliche Zeit- und Geldersparnis dar und bietet die Möglichkeit, amplifizierte und damit in der Phagensuspension nachgewiesene Genfragmente als homologe Sonden in Screenings einzusetzen (MÜLHARDT, 1999).

Wie bereits in Tabelle 1 unter 3.1.12 dargestellt, wurden in einem Aminosäure-Alignment der Phosphattransporter von *Glomus versiforme* (HARRISON & VAN BUUREN, 1995), *Saccharomyces cerevisiae* (BUN-YA ET AL., 1991) und *Neurospora crassa* (VERSAW, 1995) konservierte Bereiche gesucht und daraus eine große Anzahl von PCR-Primern abgeleitet. Die geringe Anzahl der zur Verfügung stehenden Daten machte es nötig, diese Primer größtenteils als degenerierte Primer zu konzipieren, d. h. als Gemische von Primern gleicher Länge mit Nukleotidaustauschen an einzelnen Positionen. Auch bis zum Abschluß dieser Arbeit wurden in die Datenbanken nur wenige neue, für ein Alignment und Primerdesign verwertbare pilzliche Sequenzen von *high-affinity* Phosphattransportern eingestellt. Unter diesen befand sich das entsprechende Gen einer weiteren *Glomus*-Art (*Glomus intraradices*, MALDONADO-MENDOZA ET AL., 2001), Sequenzen aus dem Genomprojekt der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, eine Sequenz von *Pholiota nameko* und die Sequenzen von vier *Gibberella*- bzw. *Fusarium*-Arten. Mit Ausnahme der beiden Phosphattransportergene der *Glomus*-Arten zeigten die genannten Sequenzen bereits im Alignment deutliche Unterschiede bzw. nur wenige Konsensbereiche für die Ableitung von weiteren Primern.

In der PCR mit degenerierten Primern treten oft Probleme auf, da mit hohen Primerüberschüssen gearbeitet werden muß, so dass jeder im Gemisch vertretene Primer mit einer gewissen Mindest-Konzentration im PCR-Ansatz vertreten ist. Der Erfolg hängt dabei stark davon ab, wie stark die Primer degeneriert sind und wie groß die Unterschiede in der Schmelztemperatur der spezifisch hybridisierenden zu den unspezifisch hybridisierenden Primern sind (GEHRIG, 1992). Dies wurde in der im Rahmen dieser Arbeit angeleiteten Staatsexamensarbeit von ARING (1997), in der u. a. erste orientierende Experimente mit den Phosphattransporterprimern durchgeführt wurden, nochmals deutlich.

Erst nach Durchführung einer *nested*-PCR unter Verwendung der aufgebauten genomischen DNA-Genbank als Template war es möglich, das oben beschriebene Teilfragment pFV 14.1 zu amplifizieren, das nach Vergleich mit in den Datenbanken gespeicherten Sequenzen die in Tabelle 6 (vgl. 4.2.1.) dargestellten Homologien zu *high-affinity* Phosphattransportern zeigt.

Die nähere Analyse der Sequenz des Teilfragments zeigt bereits im Aminosäurealignment (vgl. Abbildung 19, 4.2.2.1), dass nur die Sequenzen der beiden *Glomus*-Arten aus den Datenbanken stark konserviert sind. Die Sequenzen des Fragments von *Geosiphon pyriformis* weicht bereits in vielen Aminosäureresten von der der *Glomus*-Arten ab, ähnliches gilt für die ebenfalls dargestellte Sequenz von *Saccharomyces cerevisiae* und die anderen, in den Datenbanken gespeicherten Pilz-Phosphattransportersequenzen. Damit unterscheiden sich die pilzlichen Phosphattransportergene entscheidend von denen, die bei Pflanzen charakterisiert wurden. Letztere zeigen über weite Strecken hohe Übereinstimmungen. Dies wird auch in der aus dem Alignment berechneten phylogenetischen Beziehung des Phosphattransporter-Genfragments von *Geosiphon pyriformis* zu den Phosphattransporterfragmenten aus Pflanzen und Pilzen deutlich. Während die Reiche *Planta*, *Fungi* und *Archaea* (Außengruppe) im berechneten Baum deutlich voneinander abgespalten werden, fallen die Wahrscheinlichkeiten für Abzweigungen innerhalb der Pflanzen deutlich geringer aus als innerhalb der Pilze (vgl. Abb. 21).

Im Bereich der Pflanzen war es in vielen Fällen gar nicht möglich, gesicherte Bootstrap-Werte für Abzweigungen im Stammbaum der Phosphattransporter zu erlangen. Auffällig ist auch, dass die *high-affinity*- und *low-affinity*-Phosphattransporter einer Pflanzenart, die bei Pflanzen üblicherweise mit Typ „1“ bzw. Typ „2“ bezeichnet werden, in der Regel

zusammen Cluster bilden. Es ist daher wahrscheinlich, dass bei den Pflanzen die Proteine der Phosphattransporter unterschiedlicher Substratspezifität durch Verdopplung eines einzelnen Gens und unterschiedlicher Mutation der beiden „Tochtergene“ entstanden sind. Innerhalb der Pflanzen ist der analysierte Teilbereich des (funktionellen) Phosphattransportergens - weil zu konserviert - als molekularer Marker für phylogenetische Analysen nicht geeignet.

Im Bereich der Pilze zeigt sich ein zu den Pflanzen gänzlich anderes Bild. Alle dargestellten Verzweigungen des phylogenetischen Baumes werden in der Maximum-Parsimony-Analyse mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit unterstützt. In der Neighbor-Joining-Analyse sind die Wahrscheinlichkeiten bestimmter Abzweigungen in der Regel zwar geringer, aber doch meistens noch gesichert. Dies stützt den aus dem Aminosäurealignment gewonnenen Eindruck, dass im Bereich der Pilze die Phosphattransportergene offensichtlich weniger konserviert sind als bei den Pflanzen. Die berechneten genetischen Distanzen zwischen den im phylogenetischen Baum benachbarten Gruppen von *Gibberella*- und *Fusarium*-Arten einerseits und Hefe, *Pholiota*- und den beiden *Glomus*-Arten andererseits sind jedoch in etwa gleich groß.

Fasst man die oben genannten Befunde zusammen, ist das Phosphattransportergen von *Geosiphon pyriformis* zweifelsfrei nachgewiesen. Als gesichert ist ebenfalls der Nachweis anzusehen, dass das amplifizierte und analysierte Genfragment tatsächlich von *Geosiphon pyriformis* stammt. Der Verdacht einer Kontaminante, wie sie bei SCHWARZOTT (2003) bei der Analyse von 18 S-rRNA Genen durch PCR und *nested*-PCR häufig nachweisbar war, lässt sich durch die genetische Distanz widerlegen.

Innerhalb des isolierten Fragmentes pFV14.1 findet sich eine 58 bp lange Teilsequenz, die im Leseraster zu einem Stop-Codon führt. Erst durch Weglassen dieses Teilbereichs kann das Fragment „in frame“ weiter abgelesen werden. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Teilsequenz um ein Intron im Phosphattransportergen von *Geosiphon pyriformis* handeln könnte. Leider fehlen hier zum einen die direkten Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Pilzen, da deren Gensequenzen – im Gegensatz zu *Geosiphon* – aus c-DNA abgeleitet wurden, bzw. im Fall von *Saccharomyces cerevisiae* keine Introns enthielten. Zum anderen waren auch Splicing-Motive nicht nachweisbar, die eine Bindestelle für die prae-mRNA prozessierende Enzyme darstellen könnten, was ein Intron auch ohne Vergleich zu anderen genomischen DNA-Sequenzen zweifelsfrei nachweisen würde.

5.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung bakterieller Gene

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals Gensequenzen identifiziert werden, die offenbar aus den *bacteria-like organisms* (BLOs) von *Geosiphon pyriformis* stammen. Diese BLOs wurden als ursprünglich bakterielle Endosymbionten in vielen AM-Pilzen beschrieben (PROZENKO, 1975; WILSON & HANTON, 1979; MACDONALD & CHANDLER, 1981; MACDONALD ET AL., 1982). Die meisten der bisherigen Erkenntnisse zu den BLOs beruhten auf Arbeiten, die sich mit der Ultrastruktur der AM-Pilze und damit auch der BLOs beschäftigten. Erst in letzter Zeit begannen auch molekularbiologische Untersuchungen zu diesem Thema, die sich mit methodischen Aspekten (HOSNY ET AL., 1999), der phylogenetischen Einordnung

(BIANCOTTO ET AL., 1996, 2000 und 2003) und funktionellen Genen (MINERDI ET AL., 1998, 2002a und 2002b; RUIZ-LOZANO & BONFANTE, 1999 und 2000) beschäftigten.

Der Nachweis, dass es sich bei dem aus der genomischen DNA-Bank mittels direkter PCR identifizierten Klon pFV40.1 tatsächlich nicht um eine Kontamination durch ubiquitäre (Boden-) Bakterien, z. B. aus der Erde der Kulturen von *Geosiphon pyriformis* handelt, wurde von WEINHARDT (2001) in einer von mir angeleiteten Diplomarbeit erbracht.

Wie unter 4.3.2 beschrieben, wurden in der vorliegenden Arbeit alle Maßnahmen ergriffen, um Kontamination des zu untersuchenden *Geosiphon*-Materials mit anderen Organismen weitestgehend zu vermeiden. Zusätzlich wurde jeder DNA-Isolationsansatz in zwei Teile aufgeteilt und zwei getrennten PCRs zugeführt. Zum einen wurde mittels PCR und *nested*-PCR mit universellen Bakterienprimern versucht, die 16 S-rRNA der bakteriellen Endosymbionten zu amplifizieren und zu charakterisieren. Zum anderen wurde versucht, mit für die pFV40.1-Sequenz spezifischen Primern dieses Fragment wieder zu amplifizieren. Außerdem wurden Negativkontrollen für die PCR ohne DNA-Template mitgeführt. Nur für solche DNA-Isolationen, bei denen beide Amplifikationen erfolgreich und die Negativkontrolle ohne Amplifikate waren, kann daher angenommen werden, dass das amplifizierte 16 S-rRNA-Gen auch tatsächlich aus den BLOs von *Geosiphon pyriformis* stammt.

5.1.3.1 Phylogenetische Einordnung der BLOs von *Geosiphon pyriforme* mit dem 16 S-rRNA Gen als molekularem Marker

Das 16 S-rRNA Gen wurde bereits von WOESE & FOX (1977) als phylogenetisches Markermolekül (molekularer Marker) eingeführt und etabliert. Dafür waren insbesondere die ubiquitäre Verbreitung, hohe Konservierung bei gleichzeitiger ausreichender Variabilität und die Abwesenheit von lateralem Gentransfer entscheidend (OLSEN & WOESE, 1993). Aufgrund der phylogenetischen Analysen, die zum Großteil heute auf direkter DNA-Isolation aus Umweltproben ohne vorheriger Kultivierung der Bakterien beruhen, wurden inzwischen mehr als ein Drittel aller bekannten bakteriellen Phyla auf der Basis von 16 S-rRNA Gensequenzen aufgestellt (DELONG & PACE, 2001; OCHSENREITER, 2002).

Im Rahmen der Arbeiten von BIANCIOTTO ET AL. (1996, 2000 und 2003) wurde die bislang einzige Art bakterieller Endosymbionten aus der AM-Pilz-Familie der *Gigasporaceae* als „*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*“ (vgl. 4.3.1) beschrieben. Diese wurde aufgrund der Sequenz des Gens ihrer kleinen ribosomalen Untereinheit in die Pseudomonaden der Gruppe II der β -Unterklasse der Proteobakterien eingeordnet. Als nächste Nachbarn innerhalb der β -Proteobakterien wurden die Gattungen *Burkholderia*, *Pandoraea* und *Ralstonia* bestimmt. Die genaue Einordnung ist in Abbildung 36 dargestellt.

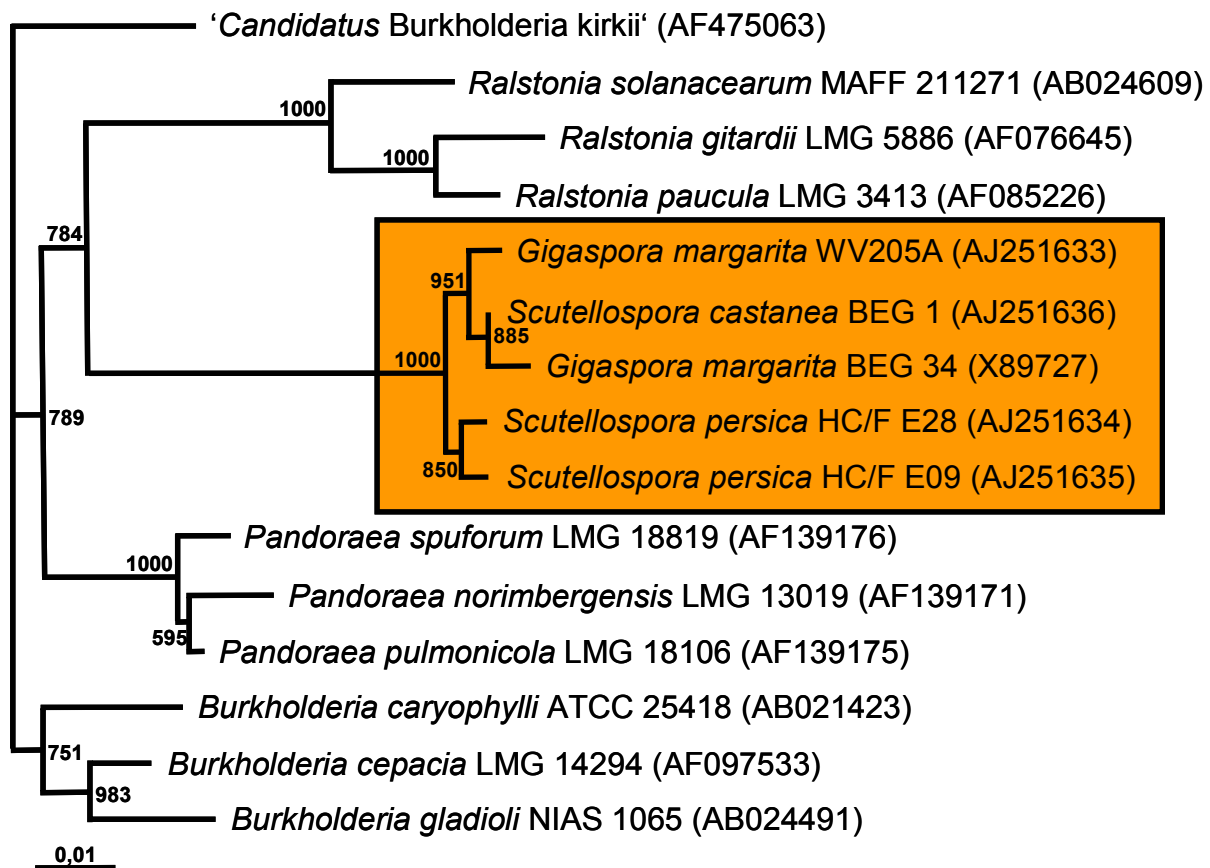


Abb. 36: phylogenetische Einordnung der bakteriellen Endosymbionten aus den *Gigasporaceae*
 Neighbor-Joining-Analyse des 16 S-rRNA-Gens mit den nächstverwandten bakteriellen Sequenzen
 aus einer BLAST-Datenbankabfrage, aus BIANCIOTTO ET AL., 2003, verändert.

Die Neighbor-Joining-Analyse (vgl. Abbildung 24, 4.3.4) die alle bei *Geosiphon pyriformis* amplifizierten 16 S-rRNA Genfragmente sowie die bekannten Sequenzen gleicher Länge der kleinen ribosomalen Untereinheit der bakteriellen Endosymbionten von *Scutellospora persica* und *Gigaspora margarita* berücksichtigte, stellt die amplifizierten und analysierten 16 S-rRNA-Sequenzen aus *Geosiphon pyriformis* in zwei weit voneinander getrennte Gruppen, nämlich a) *Rhodocyclus*-Gruppe/*Neisseriaceae* bzw. γ -Proteobakterien und b) *Oxalobacter*-Gruppe. Damit stellt sich die Frage, ob die BLOs von *Geosiphon pyriformis* entweder aus zwei phylogenetisch weit voneinander getrennten Populationen bestehen, oder nicht doch Genfragmente anderer kontaminierender Bakterien amplifiziert wurden.

Es konnte jedoch ausschließlich aus den DNA-Isolationsansätzen der in der *Oxalobacter*-Gruppe [b], vgl. Abbildung 24 oben, 4.3.4] ein Cluster bildenden 16 S-rRNA-Sequenzen auch die bereits vorher bekannte Sequenz des zu einem bakteriellen Zuckertransporter vom ABC-Typ homologen Fragments amplifiziert werden, niemals jedoch aus den DNA-Isolationsansätzen der übrigen Fragmente. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den in der Gruppe a) gruppierten bakteriellen Sequenzen um Kontaminationen handelt und die bakteriellen Endosymbionten von *Geosiphon pyriformis* in die *Oxalobacter*-Gruppe der β -Proteobakterien einzuordnen sind.

Auffällig ist in der genannten Abbildung die große genetische Distanz zwischen den bakteriellen Endosymbionten von *Geosiphon pyriformis* auf der einen und Arten aus den

Gigasporaceae auf der anderen Seite. Da bislang aber ungeklärt ist, ob die Aufnahme der bakteriellen Endosymbionten in den Pilz ein- oder mehrmalig vor oder nach der Trennung der Pilzlinien erfolgte, ist die große genetische Distanz nicht unwahrscheinlich. Zusätzlich unterstützt wird die große genetische Distanz durch die Beschreibung der bakteriellen Endosymbionten aus *Gigasporaceae*. Diese als *Glomeribacter* beschriebene Gruppe besitzt eine Vakuolenmembran des Wirts um einzelne oder Gruppen bakterieller Endosymbionten. Bei den in Abbildung 22 (vgl. 4.3.1) dargestellten BLOs von *Geosiphon pyriformis* ist eine solche Wirtsmembran nicht nachweisbar (SCHÜßLER & KLUGE, 2001). Des Weiteren ist nicht geklärt, ob *Gigaspora margarita* nicht mehrere verschiedene bakterielle Endosymbionten beherbergt (SCHÜßLER, PERSÖNLICHE MITTEILUNG), und nach Berechnungen von SCHWARZOTT ET AL. (2001) und SCHÜßLER ET AL. (2001) ist die genetische Distanz zwischen den Pilz-Wirten der *Gigasporaceae* und *Geosiphon pyriformis* ebenfalls so groß, dass eine solche genetische Distanz der bakteriellen Endosymbionten zumindest im Bereich des Möglichen erscheint.

5.1.3.2 ABC-Typ-Hexosetransporter

Auch der bakterielle Ursprung des Fragments eines Hexosetransporters vom ABC-Typ ist gesichert. Wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, wurde die Ähnlichkeit mit einem ABC-Typ-Hexosetransporter von *Sinorhizobium meliloti* in einer BlastX-Datenbankrecherche mit 86 % (vgl. Tabelle 7, 4.3.1) bestimmt. Außerdem wurden durch die Blast-Funktion ausschließlich bakterielle Transportproteine vom ABC-Typ als ähnlich eingestuft, wodurch der bakterielle Ursprung des Klon pFV40.1 als klar nachgewiesen angesehen werden kann.

Allgemein geht man davon aus, dass eine Sequenzähnlichkeit von etwa 90 % bei einem Gen als sichere Bestimmung gilt, bei funktionellen Genen kann diese Ähnlichkeit jedoch unter Umständen deutlich geringer sein. HILLIS (1987) definierte beispielsweise einen molekularen Marker für systematische Zwecke so, dass der Basenaustausch in der genomischen DNA enkoppelt sein muß und so verschiedene Bereiche des Gens in ihrer Evolutionsgeschwindigkeit unabhängig sind. Dies bedeutet, dass ein Basenaustausch in einem für die Funktion eines Proteins essentiellen Genbereich zu einem Ausfall des entsprechenden Enzyms führt und daher schnell wieder eliminiert wird. Solche Sequenzbereiche haben eine geringe Evolutionsgeschwindigkeit, während Mutationen in anderen Bereichen desselben Gens unter Umständen keine Auswirkungen auf die Funktionalität des codierten Proteins haben und deswegen häufiger stabil bleiben.

Während der im Rahmen dieser Dissertation angeleiteten Diplomarbeit von WEINHARDT (2001) sollte auch versucht werden, die Sequenz des ABC-Typ-Hexosetransporters bakterieller Endosymbionten von *Geosiphon pyriformis* zu vervollständigen. Dazu wurden „chromosome-walking“-Techniken (vgl. 3.2.5.3.2) angewendet, Sonderformen der PCR, bei denen versucht wurde, Sequenzbereiche zu amplifizieren, welche bekannte Genabschnitte flankieren. Vermutlich aus folgenden Gründen war dieser Ansatz jedoch nicht erfolgreich:

Die inverse PCR (OCHMAN ET AL., 1988; TRIGLIA ET AL., 1988) beruht auf einem Vollverdau genomischer DNA mit einer Restriktionsendonuclease, die die DNA innerhalb des bereits bekannten Fragments nicht spaltet. Die so geschnittene DNA wird dann direkt wieder ligiert, wobei bei Fragmenten zwischen 2000 und 7000 bp in erhöhtem Maße die beiden Enden eines einzelnen Fragments verbunden werden, d. h. nach der Religation liegen diese Fragmente in zirkularisierter Form vor. Dabei bleibt es mehr oder minder dem Zufall

überlassen, ob ein gesuchter Genabschnitt auf einem Restriktionsfragment entsprechender Größe liegt. Die Methode wird häufig zur Analyse von Cosmiden angewandt (MÜLHARDT, 1999), in diesem Fall lässt sich die eingesetzte DNA leicht in ausreichender Menge zur Methodenoptimierung bereitstellen. Für die Zirkularisierung ist außerdem eine Verdünnung des Restriktionsansatzes nötig. Dies führt dazu, dass für eine nachfolgende PCR das DNA-Template entweder wieder aufkonzentriert werden muß, wobei unter Umständen Verluste auftreten, oder die Template-Konzentration in der PCR zu gering für eine erfolgreiche Amplifikation ist.

Die ebenfalls eingesetzte „supported“ PCR (BLOOMQUIST ET AL., 1992; RUDENKO ET AL., 1993) beruht auf der Anreicherung des DNA-Templates mittels Biotin-gekoppelten Nucleotiden in einer linearen PCR, die dann über eine Streptavidin-Kopplung spezifisch aus dem DNA-Pool isoliert werden können. An die so entstandenen DNA-Moleküle werden anschließend Linker als künstlich eingefügte Bindestellen für einen dafür spezifischen Primer ligiert und eine reguläre PCR mit passenden Primern durchgeführt. Dabei stellt besonders die lineare PCR zu Beginn, die mit nur einem genspezifischen Primer durchgeführt wird, den empfindlichen Teilschritt für diese Methode dar. Da keine exponentielle Vermehrung der Produkte dieser Reaktion möglich ist, kann eine erfolgreiche Amplifikation flankierender Sequenzen daran scheitern, dass nicht genügend Template in der linearen PCR gebildet wird und deshalb eine Amplifikation flankierender Teilsequenzen des ABC-Typ-Hexosetransporters nicht möglich war.

5.2 Physiologische Untersuchungen zum Phosphatstoffwechsel

Die wichtige Frage, ob das symbiotische System *Geosiphon pyriformis* überhaupt anorganisches Phosphat von außen aufnimmt und metabolisiert, kann aufgrund der vorliegenden Arbeit nun eindeutig positiv beantwortet werden. Wie in den Abbildungen 28-30 dargestellt, sind bereits nach einer $^{32}\text{P}_i$ -Fütterungszeit von wenigen Sekunden markierte Stoffwechselintermediate in den Extrakten aus den *Geosiphon*-Blasen nachweisbar. Das Gleiche gilt auch für die freien *Nostoc*-Zellen. Neben den markierten organischen Verbindungen enthielten die Extrakte erwartungsgemäß auch freies $^{32}\text{P}_i$ (vgl. Abb. 27). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimente lassen keine Aussage darüber zu, in welche Kompartimente P_i aufgenommen und wo es u. U. angereichert wird. Lokalisierung von Phosphor in *Geosiphon*-Blasen mittels PIXE (MAETZ ET AL. 1999) zeigten, daß diese in der Tat beträchtlich Phosphat anreichern, und zwar außerhalb des die endosymbiontischen *Nostoc*-Zellen enthaltenden Symbiosoms. Es ist sehr wahrscheinlich, daß das aufgenommene P_i vor allem in die großen Vakuolen der *Geosiphon*-Blasen gelangt und dort gespeichert wird. Die durchgeführten Pulse-Chase-Experimente zeigen aber, daß diese Speicherung reversibel ist und P_i sehr schnell in den Zellstoffwechsel gelangt.

Aus später noch zu diskutierenden methodischen Gründen können derzeit noch keine genauen Aussagen über die Affinität des P_i -Aufnahmesystems von *Geosiphon* gemacht werden. Die Tatsache, daß der Tracer durch *Geosiphon* aus einer Lösung mit extrem niedrigem Phosphatgehalt (max. 5,4 nM, vergl. Abb. 26) aufgenommen und metabolisiert wurde, läßt immerhin den Schluß zu, daß der für die Aufnahme verantwortliche Phosphattranslokator eine hohe Affinität zu seinem Substrat haben muß. Molekularbiologische Daten (GEHRIG ET AL. 1996, SCHÜßLER, 1995, 1999 UND 2002; SCHÜßLER

ET AL., 2001; SCHWARZOTT ET AL., 2001) belegen die sehr enge Verwandtschaft von *Geosiphon* zu *Glomus* und anderen AM-Pilzen. Außerdem zeigt die hier vorliegende Arbeit zumindest für eine Teilsequenz, daß die Struktur des Phosphattranslokators von *Geosiphon* weitgehend mit der des P_i -Translokators bestimmter *Glomus*-Arten übereinstimmt. Schließlich ist die Affinität des P_i -Translokators zu seinem Substrat für bestimmte *Glomus*-Arten bekannt (THOMSON ET AL., 1990 bzw. HARRISON & VAN BUUREN, 1995 und MALDONADO-MENDOZA ET AL., 2001). Der K_M -Wert liegt bei ca. 18 μ M, jedoch bei heterologer Expression des Phosphattranslokators von *Glomus versiforme* in Hefezellen (HARRISON & VAN BUUREN, 1995). Aus den drei genannten Gründen darf vermutet werden, daß die Affinität des P_i -Translokators von *Geosiphon* in ähnlicher Größenordnung liegt.

Hinsichtlich der Metabolisierung des einmal aufgenommenen Phosphats zeigten vor allem die Pulse-Chase-Experimente deutliche Unterschiede zwischen den *Geosiphon*-Blasen einerseits und freilebenden *Nostoc*-Zellen andererseits:

Im Falle der Blasen wurde der Tracer aus dem P_i -Pool schneller und an eine größere Zahl von Metaboliten weitergegeben (vergl. Abb. 31 und 33). Die Gründe für diesen Unterschied sind noch unklar. Es ist denkbar, dass im Falle der *Geosiphon*-Blasen das Phosphat in einem Kompartiment zwischengespeichert wird, aus dem es schnell remobilisiert und dem Stoffwechsel zugeführt werden kann. Hier kommen vor allem die vielen Vakuolen in Frage, die bei *Geosiphon* für das Cytoplasma des Pilzes sehr typisch sind (SCHNEPF, 1964; SCHÜßLER, 1995). Cyanobakterien hingegen besitzen keine derartigen Vakuolen, sondern sie lagern Phosphat in elektronenoptisch leicht nachweisbaren Polyphosphatkörpern ein (GARRITY ET AL., 2001; STRASBURGER ET AL., 2002). Es könnte sein, daß das Phosphat dieser Polyphosphatkörper dem Stoffwechsel weniger leicht zugänglich ist. Der aktivere Phosphatstoffwechsel der *Geosiphon*-Blasen könnte auch in der symbiotischen Interaktion der beiden Symbiosepartner begründet sein. Leider ist bisher bei *Geosiphon* über den intrazellulären Stoffaustausch zwischen den Symbiosepartnern noch nichts bekannt, so dass diese Annahme sehr spekulativ bleibt.

Die durchgeführten Experimente haben aber indirekte Hinweise erbracht, dass im Falle der *Geosiphon*-Blasen die endosymbiontischen *Nostoc*-Zellen am Phosphatstoffwechsel beteiligt sein müssen. Die im Licht deutlich höhere Markierung von 3-Phosphoglycerinsäure (vergl. Abb. 29) und α -Glycerophosphat (Daten nicht gezeigt bzw. vergl. Abb. 35 [Pulse-Chase]), also von Produkten des Calvin-Zyklus, lässt sich am leichtesten durch Annahme der Beteiligung der Photosynthese erklären, die bei *Geosiphon* nur in den eingeschlossenen *Nostoc*-Zellen ablaufen kann. Dass diese endosymbiontischen *Nostoc*-Zellen photosynthetisch aktiv sind und auch Stickstoff fixieren, wurde auch anderweitig gezeigt (BILGER ET AL. 1994; KLUGE ET AL. 1992).

Es fällt auf, dass bei den ^{32}P -Tracerexperimenten Nukleotidphosphate, und hier insbesondere ATP sehr schnell, und vor allem im Falle der *Geosiphon*-Blasen, relativ besonders stark markiert wurden. Dabei fällt besonders auf, dass sowohl bei den *Geosiphon*-Blasen als auch bei den freien *Nostoc*-Zellen der ATP-Pool im Licht deutlich geringer markiert ist als im Dunkeln. Üblicherweise ist der ATP-Verbrauch für Phosphorylierungen im Dunkeln geringer und damit der ATP-Pool größer als im Licht. Dies gilt meist auch für photosynthetisch aktive Pflanzenteile und Algen bis hin zur ATP-Limitierung der Photosynthese (STRASBURGER ET AL., 2002). Der oben genannte Befund ist also vorläufig dahingehend zu erklären, dass im Licht bei der photosynthetischen CO_2 -Assimilation oder bei der Transportarbeit zwischen den Partnern, wie beispielsweise beim Transport von

Photosyntheseprodukten von den *Nostoc*-Zellen zum Pilzpartner, erhöhter Bedarf an ATP besteht und dieses daher im Licht stärker aus dem ATP-Pool entnommen wird.

Die hier aufgezeigten physiologischen Experimente stellen nur einen Anfang für weitere Untersuchungen dar. Wirkliche Fortschritte setzen aber die Lösung folgender Probleme voraus:

1. Für wirklich quantitative Ansätze zur Stoffaufnahme oder -abgabe des Systems *Geosiphon* muß das Problem der geeigneten Bezugsgröße gelöst werden. Der Bezug eines Parameters auf die Anzahl der eingesetzten Blasen ist ungeeignet, da er große Streuungen der Meßergebnisse hervorruft. Einer der Gründe hierfür ist, dass sich die aus einer Kultur für die Experimente gesammelten Blasen nicht im gleichen Entwicklungsstadium befinden und daher physiologisch wahrscheinlich nicht gleichwertig sind.
2. Zur Beurteilung der physiologischen Leistungsfähigkeit der beiden Symbiosepartner und zur Erforschung des Stoffaustauschs zwischen ihnen wäre es erforderlich, *Geosiphon* in solchen Mengen zu kultivieren, dass sich eine saubere Trennung der Partner voneinander und deren getrennte Untersuchung verwirklichen lässt. Trotz vieler Versuche im eigenen als auch in anderen Labors ist dies bisher noch nicht gelungen. Die Lösung dieses Problems könnte die Erforschung von *Geosiphon* ganz beträchtlich vorantreiben.

Für die Bestimmung der Substrat-Affinität des bei *Geosiphon* für die Phosphataufnahme verantwortlichen Translokators gäbe es allerdings auch einen Weg, der ohne Transportuntersuchungen direkt am Objekt auskäme und der im Falle bestimmter AM-Pilze bereits erfolgreich beschritten wurde: Ist die kodierende Nukleotidsequenz und damit die Aminosäuresequenz bekannt, könnte an heterologe Genexpression des fraglichen Translokators, z. B. in Defektmutanten von Hefe gedacht werden. Mit derart rekonstituierten Hefezellen könnten dann die Transporteigenschaften des Phosphattranslokators von *Geosiphon pyriformis* genauer charakterisiert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zur quantitativen Auswertung der Dünnschichtautoradiogramme, die zunächst gegenüber der direkten Messung der Radioaktivität auf den Chromatogrammen Vorteile zu bieten schien, erwies sich schließlich doch als wenig geeignet, vor allem wegen der großen Streubreite der Meßergebnisse. Um wirklich praktikabel zu sein, müsste die Methode wesentlich verfeinert werden. Dies konnte jedoch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit sein. Der Vollständigkeit halber wird die Methode auf dem gegenwärtigen Stand der Entwicklung im Anhang dargestellt.

5.3 Ausblick

Sobald genügend Sporenmaterial von *Geosiphon pyriformis* zur Verfügung steht, sollte für weitere Arbeiten eine zweite genomische DNA-Bank auf Basis eines anderen Vektors mit größerer Kapazität (z. B. Cosmide) aufgebaut werden. Beide Genbanken zusammen würden molekularbiologische Experimente nahezu unabhängig von dem immer noch instabilen Kultursystem machen. Außerdem könnte man eine zweite Genbank mit dem Fragment pFV14.1 als Sonde nochmals screenen und dann einen Vollängenklon isolieren. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund der bei den Pilzen offensichtlich wenig konservierten Sequenzen der *high-affinity* Phosphattransporter erfolgversprechender als die Anwendung von PCR-Methoden.

Zur Isolierung und Charakterisierung von Genen, die *Geosiphon pyriformis* in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen exprimiert, ist ein stabiles Kultursystem essentiell. Davon ausgehend lässt sich zum einen eine cDNA-Genbank erstellen, zum anderen wird es erst mit einem stabilen Kultursystem möglich, über RT-PCR-basierte Methoden, wie RACE, Differential Display oder subtraktiver Hybridisierung für bestimmte Kulturbedingungen (insbesondere verschiedene Nährstoffangebote) wichtige, speziell exprimierte Gene zu isolieren und zu charakterisieren. Letztgenannte Experimente werden in der Arbeitsgruppe durch H. Martin bereits vielversprechend durchgeführt.

Ausgehend von der bestehenden genomischen DNA-Bank könnten Screenings auch mit dem bakteriellen ABC-Typ-Hexosetransporterfragment durchgeführt werden, um die Sequenz zu vervollständigen. Zur genauen Beschreibung der BLOs von *Geosiphon pyriformis* als neue, nicht kultivierbare Bakterienart (MURRAY & SCHLEIFER, 1994; MURRAY & STACKEBRANDT, 1995; vgl. BIANCIOTTO ET AL., 2003) fehlen wichtige Informationen, wie Größe, Aufbau des Mureinsacculus, Anzahl lebender Zellen pro Pilzspore, etc. Zusätzlich muß eine für das Taxon typische, d. h. nur innerhalb dieses Taxons vorkommende Region im 16 S-rRNA Gen charakterisiert und der spezifische Nachweis dieses Taxons mit PCR oder *in-situ*-Hybridisierung beschrieben werden. Die entsprechenden Experimente wären eventuell innerhalb einer Diplomarbeit durchzuführen.

Für weitere Experimente zur Physiologie des Phosphatstoffwechsels von *Nostoc punctiforme* und *Geosiphon pyriformis* wurden wichtige methodische Grundlagen gelegt. Durch die besonderen Eigenschaften der *Geosiphon*-Symbiose lassen sich durch solche Fütterungsexperimente wichtige Informationen über den Phosphataustausch zwischen den Symbiosepartnern gewinnen, die sicherlich auch Modellcharakter für die arbuskuläre Mycorrhiza hätten. Da die Cyanobakterien keine Probleme bei der Kultivierung bereiten, wären auch diese Experimente, insbesondere zur Aufnahmekinetik von Phosphat, kurzfristig möglich. Gleiches gilt für die entsprechenden Experimente bei *Geosiphon pyriformis*, sofern genügend Kulturmateriel zur Verfügung steht. Im Rahmen der Auswertung dieser Fütterungsexperimente erscheint eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zur Bearbeitung bioinformatischer Fragestellungen mit Informatikern sinnvoll.

6 Literaturverzeichnis

AMES, R. N.; REID, C. P. P.; PORTER, L. K. & CAMBARDELLA, C.; 1983:

Hyphal uptake and transport of nitrogen from ^{15}N -labelled sources by *Glomus mossae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus
New Phytol. **95** (3); 381-396

ARING, C.; 1997:

Präparation von Nukleinsäuren aus Pilzen der Ordnung *Glomales*: Etablierung von PCR und Sequenzanalyse
Staatsexamensarbeit, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt

BECKER, D.; KLUGE, M. & ZIEGLER, H.; 1971:

Der Einbau von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in organische Verbindungen durch Siebröhrensaft
Planta (Berl.) **99**; 154-162

BIANCIOTTO, V.; BANDI, C.; MINERDI, D.; SIRONI, M.; TICHY, H. V. & BONFANTE, P.; 1996:

An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria
Appl. Environ. Microbiol. **62**; 3005-3010

BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; LANFRANCO, L.; MINERDI, D.; BONFANTE, P. & PEROTTO, S.; 2000:

Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family *Gigasporaceae*
Appl. Environ. Microbiol. **66**; 4503-4509

BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; BONFANTE, P. & VANDAMME, P.; 2003:

'*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi
Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. **53** (1); 121-124

BIELESKI, R. L. & LATIES, G. G.; 1963:

Turnover rates of phosphate esters in fresh and aged slices of potato tuber tissue
Plant Physiol. **38**; 586-594

BILGER, W.; BÜDEL, B.; MOLLENHAUER, R. & MOLLENHAUER, D.; 1994:

Photosynthetic activity of two developmental stages of a *Nostoc* strain (Cyanobacteria) isolated from *Geosiphon pyriforme* (Mycota)
J. Phycol. **30**; 225-230

BLOOMQUIST, B. T.; JOHNSON, R. C. & MAINS, R. E.; 1992:

Rapid isolation of flanking genomic DNA using Biotin-RAGE, a variation of single-sided polymerase chain reaction
DNA and Cell Biol. **11**; 791-797

BUN-YA, M.; NISHIMURA, M.; HARASHIMA, S. & OSHIMA, Y.; 1991:

The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter
Mol. Cell. Biol. **11**; 3229-3238

COOPER, K. M. & TINKER, P. B.; 1978:

Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II.
Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur
New Phytol. **81**; 43-52

DALAL, RC; 1999:

Soil organic phosphorus
Adv. Agronomy **29**; 83-117

DELONG E. F. & PACE N. R.; 2001:

Environmental diversity of bacteria and archaea
Syst. Biol. **50**; 470-478

FALBE, J. & REGITZ, M. (HRSG.); 1992:

Römpp Chemie Lexikon; 9. erweiterte und neubearbeitete Auflage, Band 5; S. 3617;
Thieme-Verlag, Stuttgart, BRD

FELSENSTEIN, J.; 1989:

PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2)
Cladistics **5**; 164-166

FEIGE, B.; GIMMLER, H.; JESCHKE, W. D. & SIMONIS, W.; 1969:

Eine Methode zur dünnstschichtchromatographischen Auftrennung von ¹⁴C- und ³²P-
markierten Stoffwechselprodukten
J. Chromatog. **41**; 80-90

GARRITY, G.; BOONE, D. R. & CASTENHOLZ, R. W. (HRSG.); 2001:

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1: The Archaea and the Deeply
Branching and Phototrophic Bacteria, 2nd Edition
Springer Verlag, New York

GEHRIG, H. H.; 1992:

Die Genfamilie der Bande 3 und Bande 3-verwandten Anionenaustauschproteine:
Vollständige Primärstruktur des AE2-Proteins und Nachweis der AE3-Genexpression
in der menschlichen Niere
Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt

GEHRIG, H. H.; SCHÜßLER, A.; & KLUGE, M.; 1996:

Geosiphon pyriforme, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (cyanobacteria), is
an ancestral member of the Glomales: Evidence by SSU rRNA analysis
J. Mol. Evol. **43** (1); 71-81

GIANNINAZZI-PEARSON V.; BRANZANTI, B. & GIANNINAZZI, S.; 1989:

In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-
arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids
Symbiosis **7**; 243-255

GREUTER, W.; MCNEILL, J.; BARRIE, F. R.; BURDET, H. M.; DEMOULIN, V.; FIGUEIRAS, T. S.; NICOLSON, D. H.; SILVA, P. C.; SKOG, J. E.; TREHANE, P.; TURLAND, N. J. & HAWKSWORTH, D. L. (EDS. & COMPILERS); 2000:

International code of botanical nomenclature (Saint Louis Code, adopted by the Sixteenth International Botanical Congress St. Louis, Missouri, July - August 1999) [Regnum Vegetabile Vol. 138]
Koeltz Scientific Books, Königstein, BRD

GRIBBLE, F. M.; LOUSSOUARN, G.; TUCKER, S. J.; ZHAO, C.; NICHOLS, C. G. & ASHCROFT, F. M.; 2003:

A novel method for measurement of submembrane ATP concentration
J. Biol. Chem. **275**; 30046-30049

HARRISON, M. J. & VAN BUUREN, M. L.; 1995:

A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*

HARRISON, M. J.; 1999:

Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis
Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **50**; 361-389

HEPPERLE, D.; 2001:

Multicolor Sequence Alignment Editor
Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, 16775 Stechlin, Germany

HEUTE, V.; 1999:

Die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase – ein molekularer Marker für die Evolution von Stoffwechselprozessen und die verwandtschaftlichen Beziehungen von Pflanzen
Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt

HILLIS, D. M.; 1987:

Molecular versus morphological approaches to systematics
Oecologia **18**; 23-42

HOLMES, D. S. & QUIGLEY, M.; 1981:

A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids
Anal. Biochem. **114**; 193-197

HOSNY, M.; VAN TUINEN, D.; JACQUIN, F.; FÜLLER, P.; ZHAO, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & FRANKEN, P.; 1999:

Arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria: how to construct prokaryotic DNA-free genomic libraries from the Glomales
FEMS Microbiology Letters **170**; 425-430

JESCHKE, W.; KIRKBY, E.; PEUKE, A.; PATE, J. & HARTUNG, W.; 1997:

Effects of P efficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.)
J. Exp. Botany **48**; 75-91

KLUGE, M.; BECKER, D. & ZIEGLER, H.; 1970:

Untersuchungen über ATP und andere organischen Phosphorverbindungen im Siebröhrensaft von *Yucca flaccida* und *Salix triandra*
Planta (Berl.) **91**; 68-79

KLUGE, M.; MOLLENHAUER, D. & MOLLENHAUER, R.; 1991:

Photosynthetic carbon assimilation in *Geosiphon pyriforme* (Kützing) Fr. v. Wettstein, an endosymbiotic association of fungus and a cyanobacterium
Planta **185**; 311-315

KLUGE, M.; MOLLENHAUER, D.; MOLLENHAUER, R. & KAPE, R.; 1992:

Geosiphon pyriforme, an endosymbiotic consortium of a fungus and a cyanobacterium (*Nostoc*), fixes nitrogen
Bot. Acta **105**; 343-344

KNAPP, E.; 1933:

Über *Geosiphon pyriforme* Fr. v. Wettst., eine intrazelluläre Pilz-Algen-Symbiose
Ber. Dtsch. Bot. Ges **51**; 210-217

KNIPPERS, R.; 1995:

Molekulare Genetik, 6. Neubearb. Aufl.
Thieme Verlag, Stuttgart, New York

KROCZEK, R. A. & SIEBERT, E.; 1990:

Optimization of Northern analysis by vacuum-blotting, RNA-transfer visualisation, and ultraviolet fixation
Anal. Biochem. **184**; 90-95

KÜTZING, F. T.; 1849:

Species algarum, 922 S.
Verlag F. A. Brockhaus, Leipzig

LEE, R. B. & RATCLIFFE, R. G.; 1983:

Subcellular distribution of inorganic phosphate in pea root tips: A quantitative study using ^{31}P -NMR
J. Exp. Botany **34**; 1222-1244

LEE, R. B.; RATCLIFFE, R. G. & SOUTON, T. E.; 1990:

^{31}P -NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar P_i content of mature maize roots: Relationship with phosphorus status and phosphate fluxes
J. Exp. Bot. **41**; 1063-1078

LIGRONE, R.; 1988:

Ultrastructure of a fungal endophyte in *Phaeoceros laevis* (L.) Prosk. (Anthocerotophyta)
Bot. Gaz. **149**; 92-100

LIGRONE, R. & LOPEZ, C.; 1989:

Cytology and development of a mycorrhiza-like infection in the gametophyte of *Conocephalum conicum* (L.) Dum. (Marchantiales, Hepatophyta)
New Phytol. **111**; 423-433

MACDONALD, R. M. & CHANDLER, M. R.; 1981:

Bacterium-like organelles in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*
New Phytol. **89**; 241-246

MACDONALD, R. M.; CHANDLER, M. R & MOSSE, B.; 1982:

The occurrence of bacterium-like organelles in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi
New Phytol. **90**; 659-663

MAETZ, M.; SCHÜßLER, A.; WALLIANOS A. & TRAXEL, K.; 1999:

Subcellular trace element distribution in *Geosiphon pyriforme*
Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B **150**; 200-207

MALDONADO-MENDOZA, I. E.; DEWBRE, G. R. & HARRISON, M. J.; 2001:

A phosphate transporter gene from the extra radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment
Mol. Plant-Microbe Interact. **14**; 1140-1148

MARSCHNER, H.; 1995:

Mineral nutrition of higher plants (2nd edition)
Academic Press, San Diego, USA

MEIER, R. & CHARVAT, I.; 1992:

Germination of *Glomus mossae* spores: Procedure and ultrastructural analysis
Int. J. Plant Sci. **153**; 514-549

MILLER, D. S. & HOROWITZ, S. B.; 1986:

Intracellular compartmentalization of adenosine triphosphate
J. Biol. Chem. **261**; 13911-13915

MIMURA, T.; 1999:

Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells
Int. Rev. Cytol. **191**; 149-200

MINERDI, D.; FANI, R.; GALLO, R. & BONFANTE, P.; 1998:

Identification of nitrogen fixation genes in *Burkholderia* endosymbionts of arbuscular mycorrhizal fungi

In:

Abstracts of the Second International Conference on Mycorrhizae. Upsala, Sweden; 120-121

MINERDI, D.; BIANCIOTTO, V. & BONFANTE, P., 2002a:

Endosymbiotic bacteria in mycorrhizal fungi: From their morphology to genomic sequences
Plant and Soil **244**; 211-219

MINERDI, D.; FANI, R. & BONFANTE, P.; 2002b:

Identification and evolutionary analysis of putative cytoplasmic McpA-like protein in a bacterial strain living in symbiosis with a mycorrhizal fungus
J. Mol. Evol. **54**; 815-824

MOLLENHAUER, D.; 1970:

Botanische Notizen Nr. 1: Beobachtungen an der Flechte *Geosiphon pyriforme*
Natur und Museum **100**; 213-223, 384

MOLLENHAUER, D.; 1988:

Weitere Untersuchungen an *Geosiphon pyriforme* - einer Lebensgemeinschaft von Pilz und Blaualge
Natur und Museum **118 (10)**; 289-309

MOLLENHAUER, D.; 1992:

Geosiphon pyriforme

In: REISSER, W. (ED.):

Algae and symbiosis: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored
Biopress, Bristol, UK; 339-351

MOLLENHAUER, D. & MOLLENHAUER R.; 1997:

Endosymbiosis between *Nostoc* and *Geosiphon pyriforme*
Film Nr. C1955, Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen

MORTON, J. B.; 2000:

Evolution of endophytism in arbuscular mycorrhizal fungi of Glomales

In: BACON, C. W. & WHITE, J. H. (EDS.):

Microbial Endophytes

Marcel Dekker, New York, USA; 121-140

MORTON, J. B. & BENNY, G. L.; 1990:

Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*
Mycotaxon **37**; 471-491

MOSSE, B.; 1956:

Fructification of an *Endogone* species causing endotrophic mycorrhizae in fruit plants
Ann. Bot. (London) **20**; 349-362

MÜLHARDT, C.; 1999:

Der Experimentator: Molekularbiologie, 1. Aufl.
G. Fischer Verlag, Stuttgart

MULLEN, M. D.; 1999:

Transformations of other elements

In: SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J. J.; HARTEL P. G. & ZUBERER, D. A. (EDS.):

Principles and applications of soil microbiology

Prentice Hall, Upper Saddle River, USA; 369-386

MURRAY, R. G. E. & SCHLEIFER, K. H.; 1994:

Taxonomic notes: A proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes
Int. J. Syst. Bacteriol. **44**; 174-176

MURRAY, R. G. E. & STACKEBRANDT, E.; 1995:

Taxonomic note: Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes
Int. J. Syst. Bacteriol. **45**; 186-187

OCHMAN, H.; GERBER, A. S. & HARTL, D. L.; 1988:

Genetic application of an inverse polymerase chain reaction
Genetics **120**; 621-623

OCHSENREITER, T.; 2002:

Molekular-ökologische und genomische Studien zur Charakterisierung von nicht kultivierten *Archaea* und *Acidobacteria*
Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt

OKAZAKI, R.; OKAZAKI, T.; SAKABE, K.; SUGIMOTO, K. & SUGINO, A.; 1968:

Mechanisms of DNA chain growth
Proc. Natl. Acad. Sci USA **59**; 598-605

OLSEN, G. J. & WOESE, C. R.; 1993:

Ribosomal RNA: A key to phylogeny
Faseb J. **7**; 113-123

ON-LINE MEDICAL DICTIONARY; 2003

Webseite: <http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd>

PAGE, R. D. M.; 1996:

TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers
Computer Appl. Biosci. **12**; 357-358

PARKE, J. L. & LINDERMAN, R. G.; 1980:

Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with the moss *Funaria hygrometrica*
Can. J. Bot. **58**; 1898-1904

PETERSON, R. L.; HOWARTH, M. J. & WHITTIER, D. P.; 1981:

Interactions between a fungal endophyte and gametophyte cells in *Psilotum nudum*
Can. J. Bot. **59**; 711-720

PIROZYNSKI, K. A. & MALLOCH, D. W.; 1975:

The origin of land plants: A matter of mycotrophism
BioSystems **6**; 153-164

PLAXTON, W. C.; 1996:

The organization and regulation of plant glycolysis
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47**; 185-214

POTASH & PHOSPHATE INSTITUTE; 2002:

Webseite: <http://www.ppi-ppic.org>

PROZENKO, M. A.; 1975:

Microorganisms in the hyphae of mycorrhiza-forming fungus
Mikrobiologiya **44**; 1121-1124

RAGHOTHAMA, K. G.; 1999:

Phosphate Acquisition
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **50**; 665-693

RANJEVA, R. & BOUDET, A. M.; 1987:

Phosphorylation of proteins in plants: Regulatory effects and potential involvement
in stimulus/response coupling
Annu. Rev. Plant Physiol **38**; 73-93

REDECKER, D.; KODNER, R. & GRAHAM, L. E.; 2000:

Glomalean fungi from the Ordovician
Science **289**; 1920-1921

REMY, W.; TAYLOR, T. N.; HASS, H. & KERP, H.; 1994:

Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**; 11841-11643

RIES, THOMAS; 1997:

Sequenzierung eines Teilbereiches der 18 S rRNA-Gene von *Glomus*-Arten
Staatsexamensarbeit, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt

ROSENDAHL, S. & TAYLOR, J.W.; 1997:

Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in
arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP
Mol. Ecol. **6**; 821-829

RUDENKO, G. N.; ROMMENS, C. M.; NIJKAMP, H. J. & HILLE, J.; 1993:

Supported PCR: An efficient procedure to amplify sequences flanking a known DNA
fragment
Plant Mol. Biol. **21**(4); 723-728

RUIZ-LOZANO, J.M. & BONFANTE, P.; 1999:

Identification of a putative P-transporter operon in the genome of a *Burkholderia* strain
living inside the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*
J. Bacteriol. **181**(13); 4106-4109

RUIZ-LOZANO, J.M. & BONFANTE, P.; 2000:

A *Burkholderia* strain living inside the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora
margarita* possesses the *vacB* gene, which is involved in host cell colonization by
bacteria
Microbial Ecology **39**; 137-144

**SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. &
ARNHEIM, N.; 1985:**

Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis
for diagnosis of sickle cell anemia
Science **230**; 1350-1354

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T.; 1989:**
Molecular cloning – A laboratory manual (2nd edition)
Cold Spring Harbor Laboratory press, New York, USA
- SANDERS, I. R.; 1999:**
No sex please, we're fungi
Nature **399**, 737-739
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A. R.; 1977:**
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74** (12); 5463-5467
- SCHACHTMAN, D. P.; REID, R. J. & AYLING, S. M.; 1998:**
Phosphorus uptake by plants: From soil to cell
Plant Physiol. **116**; 447-453
- SCHNEPF, E.; 1964:**
Zur Feinstruktur von *Geosiphon pyriforme*
Arch. Mikrobiol. **49**; 112-207
- SCHMID, E. & OBERWINKLER, F.; 1993:**
Mycorrhiza-like interactions between the achlorophyllous gametophyte of *Lycopodium clavatum* (L.) and its fungal endophyte studied by light and electron microscopy
New Phytol. **124**; 69-81
- SCHOPFER, P. & BRENNICKE, A. (HRSG.); 1999:**
Pflanzenphysiologie, 5. grundlegend überarbeitete und aktualisierte Auflage,
Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- SCHÜßLER, A.; 1995:**
Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Pilz/Blualgen Endosymbiose *Geosiphon pyriforme*: Physiologie, Zellbiologie und Taxonomie
Dissertation, Universität Heidelberg, Heidelberg
- SCHÜßLER, A.; 1999:**
Glomales SSU rRNA gene diversity
New Phytol. **144**; 205-207
- SCHÜßLER, A.; 2000:**
Glomus claroideum forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*
Mycorrhiza **10**; 15-21
- SCHÜßLER, A.; 2002:**
Molecular phylogeny, taxonomy and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi
Plant and Soil **244**; 75-83

SCHÜßLER, A.; MOLLENHAUER, D.; SCHNEPF, E. & KLUGE, M.; 1994:

Geosiphon pyriforme, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: The spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi
Bot. Acta **107**; 36-45

SCHÜßLER, A.; SCHNEPF, E.; MOLLENHAUER, D. & KLUGE, M.; 1995:

The fungal bladders of the endocyanosis *Geosiphon pyriforme*, a *Glomus*-related fungus: Cell wall permeability indicates a limiting pore radius of only 0,5 nm
Protoplasma **185**; 131-139

SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D. & WALKER, C.; 2001:

A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution
Mycol Res. **105 (12)**; 1413-1421

SCHÜßLER, A. & KLUGE, M.; 2001:

Geosiphon pyriforme, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research;

In: HOCK, B. (ED.):

The Mycota IX – Fungal associations

Springer Verlag Berlin/Heidelberg; 151-161

SCHWARZOTT, D. & SCHÜßLER, A.; 2001:

A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA-extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores
Mycorrhiza **10**; 203-207

SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. & SCHÜßLER, A.; 2001:

Glomus, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*) is nonmonophyletic
Mol. Phylogenet. Evol. **21 (2)**; 190-197

SHORT, J. M.; FERNANDEZ, J. M.; SORGE, J. A. & HUSE, W. D.; 1988:

Lambda ZAP: A bacteriophage Lambda expression vector with in vivo excision properties
Nucl. Acids Res. **16 (15)**; 7583-7600

SMITH, S. E. & GIANINAZZI-PEARSON, V.; 1988:

Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plant
Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **39**; 221-244

SMITH, S. E. & READ, D. J.; 1997:

Mycorrhizal Symbioses (2nd edition)
Academic Press, London

STAHL, M.; 1949:

Die Mycorrhiza der Lebermoose mit besonderer Berücksichtigung der thallösen Formen
Planta **37**; 103-148

STITT, M.; 1990:

Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **41**; 153-185

STRASBURGER, E., SITTE, P., WEILER, E. W., KADEREIT, J. W., BRESINSKY, A., KÖRNER, C. (HRSG.); 2002:

Strasburger - Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

STUBBLEFIELD, S. P.; TAYLOR, T. N. & TRAPPE, J. M.; 1987:

Fossil mycorrhizae: A case for symbiosis
Science **237**; 59-60

SWARD, R. J.; 1981A:

The structure of the spores of *Gigaspora margarita*. I. The dormant spore
New Phytol. **87**; 761-768

SWARD, R. J.; 1981B:

The structure of the spores of *Gigaspora margarita*. II. Changes accompanying germination
New Phytol. **88**; 661-666

SWARD, R. J.; 1981C:

The structure of the spores of *Gigaspora margarita*. III. Germ-tube emergence and growth
New Phytol. **88**; 667-673

TAIZ, L. & ZEIGER, E.; 2002:

Plant Physiology, 3rd Edition
suppl. website: <http://www.plantphys.net>
Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA, USA

TAYLOR, T. N.; REMY, W.; HASS, H. & KERP, H.; 1995:

Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian
Mycologia **87**; 560-573

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J.; 1994:

CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice
Nucl. Acids Res. **22**; 4673-4680

THOMSON, B. D.; CLARKSON, D. T. & BRAIN, P.; 1990:

Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*
New Phytol. **116**; 647-653

TRIGLIA, T.; PETERSON, M. G. & KEMP, D. L.; 1988:

A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences
Nucl. Acids Res. **16**; 8186

VERSAW, W. K.; 1995:

A phosphate-repressible, high-affinity phosphate permease is encoded by the *pho-5⁺* gene of *Neurospora crassa*
Gene **153**; 135-139

VON WETTSTEIN, F.; 1915:

Geosiphon Fr. v. Wettst., eine neue, interessante Siphonee
Österr. Bot. Z. **65**; 145-156

VOET, D. & VOET, J. G.; 1994:

Biochemie, 1. Aufl.
VCH Verlag, Weinheim

WEINHARDT, S.; 2001:

Bakterielle Endosymbionten in *Geosiphon pyriforme* - Charakterisierung des
16 S rRNA- sowie eines Zuckertransportergens
Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt

WILLIS, L. B. & WALKER, G. C.; 1999:

A novel *Sinorhizobium meliloti* operon encodes an alpha-glucosidase and a
periplasmatic-binding-protein-dependent transport system for alpha-glucosides
J. Bacteriol. **181** (14); 4176-4184

WILSON, J. F. & HANTON, W. K.; 1979

Bacteria-like structures in fungi
In: LEMKE, P. A. (ED.):
Series on Mycology, Vol. 1: Viruses and Plasmids in Fungi.
Marcel Dekker Inc., New York/Basel; 525-537

WOESE, C. R. & FOX, G. E.; 1977:

Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms
Proc. Natl. Acad. Sci USA **74**; 5088-5090

ZÉZÉ, A.; DULIEU, H. & GIANINAZZI-PEARSON, V.; 1994:

DNA cloning and screening of a partial genomic library from an arbuscular
mycorrhizal fungus, *Scutellospora castanea*
Mycorrhiza **4**; 251-254

Zitat

Non est ad astra mollis e terris via
(Seneca)

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Frank Volz
Geburtsdatum und -ort: 15. Juli 1971 in Groß-Umstadt
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977 - 1981 Grundschole
Rodensteinschule, Fränkisch-Crumbach
1981 - 1983 Förderstufe
Georg-August-Zinn-Schule, Reichelsheim
1983 - 1990 gymn. Mittel- und Oberstufe
Albert-Einstein-Schule, Groß-Bieberau

Abschluß: Abitur

Grundwehrdienst

07/1990 - 06/1991 2. / SanBtl. 2, Marburg

Studium

WS 1991/92 - SS 1992 Chemische Technologie
an der FH Darmstadt
WS 1992/93 - SS 1997 Studium Lehramt an Gymnasien
Fächerkombination Biologie und Chemie
an der TU Darmstadt

Examensarbeit unter Leitung von Prof. Dr. M. Kluge
und Dr. H. Gehrig

Abschluß:
1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien

WS 1997/98 - SS 2004 Promotionsstudium Biologie
an der TU Darmstadt

Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. M. Kluge,
Dr. H. Gehrig und Dr. A. Schüßler

05/2001 Abschluss der experimentellen Arbeiten

Berufstätigkeit

Seit 11/2001 Berater Human Resources / Coach
bei der PEBG mbH in Darmstadt

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Es wurde bisher kein Promotionsversuch unternommen.

Brensbach, 16. März 2004